

<http://www19.ipdl.ncipi.go.jp/PA1/result/detail/main/wAAANkaaRpDA411196873...> 2006/09/06

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(10) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-196873

(43) 公開日 平成11年(1999) 7 月27日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/09	Z N A A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	A E D D
39/395	A E D	45/00	A B E
45/00	A B E	48/00	

審査請求 未請求 請求項の数41 F D 外国語出願 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-369757

(22) 出願日 平成9年(1997)12月9日

(71) 出願人 501002957

スミスクライン・ビーチャム・コーポレイ  
ション

SMITHKLINE BEECHAM  
CORPORATION

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-  
0939、キング・オブ・ブルシア、スウェー  
ドランド・ロード709番

(72) 発明者 ビーター・コーロン・マクドネル

アメリカ合衆国19027ペンシルベニア州エ  
ルキンズ・パーク、チュルブホッケン・ア  
ベニュー8311番

(74) 代理人 弁理士 青山 操 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤結合蛋白

(57) 【要約】

【課題】 サイトカイン抑制抗炎症薬 (CSAID) 結  
合タンパク質 (CSBPβ)、そのタンパク質をコード  
する遺伝子およびこの薬理学的クラスの薬物の評価およ  
び特徴付けに有用なアッセイおよびスクリーンが望まれ  
ている。

【解決手段】 本発明は、 (a) 配列番号2のアミ  
ノ酸からなるポリペプチドをコードするポリスクレオチ  
ドに対して少なくとも7.5%の同一性を有するポリスク  
レオチド; (b) 遺伝暗号の重複性により、配列番号2  
と同じアミノ酸をコードするポリスクレオチド; (c)  
(a) または (b) のポリスクレオチドに対して相補性  
のポリスクレオチド; および (d) (a)、(b) また  
は (c) のポリスクレオチドの少なくとも連続した15  
塩基からなるポリスクレオチドからなる群より選択され  
るメンバーからなる単離ポリスクレオチドを提供するも  
のである。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号2のアミノ酸からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも75%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(b) 遺伝暗号の重複性により、配列番号2と同じアミノ酸をコードするポリヌクレオチド；

(c) (a) または (b) のポリヌクレオチドに対して相補性のポリヌクレオチド；および

(d) (a)、(b) または (c) のポリヌクレオチドの少なくとも連続した15塩基からなるポリヌクレオチドからなる群より選択されるメンバーからなる単離ポリヌクレオチド。

【請求項2】 ポリヌクレオチドがDNAである請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 ポリヌクレオチドがRNAである請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号1に示されるヌクレオチドからなる請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 配列番号1に示されるヌクレオチド1-1838からなる請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 配列番号2のアミノ酸からなるポリペプチドをコードする請求項2記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項2記載のDNAからなるベクター。

【請求項8】 請求項7記載のベクターからなる宿主細胞。

【請求項9】 請求項8記載の宿主細胞からそのDNAによってコードされるポリペプチドを発現させることを特徴とするポリペプチドの製造法。

【請求項10】 ポリペプチドを発現する細胞の製造法であって、細胞がベクター中に含まれるヒトcDNAによりコードされるポリペプチドを発現するように、該細胞を請求項7に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクションすることからなる方法。

【請求項11】 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項12】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項13】 請求項11記載のポリペプチドに対するアゴニスト。

【請求項14】 請求項11記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項15】 請求項11記載のポリペプチドに対するアンタゴニスト。

【請求項16】 CSBP $\beta$ を必要とする患者の治療方法であって、請求項11記載のポリペプチドの治療上有効量を該患者に投与することからなる治療方法。

【請求項17】 ポリペプチドをコードするDNAを患者に付与し、インビボにて該ポリペプチドを発現させる

ことにより、該ポリペプチドの治療上有効量を投与することからなる請求項16記載の方法。

【請求項18】 CSBP $\beta$ ポリペプチドを必要とする患者の治療方法であって、請求項15記載のアンタゴニストの治療上有効量を該患者に投与することからなる方法。

【請求項19】 請求項11に記載のポリペプチドの発現に関与する疾患または該疾患に対する罹病性の診断方法であって、該ポリペプチドをコードする核酸配列における変異を測定することからなる方法。

【請求項20】 宿主から由来のサンプル中の請求項11記載のポリペプチドの存在について分析することからなる診断方法。

【請求項21】 請求項11記載のポリペプチドに対するレセプターに結合し、そのレセプターを活性化または阻害する化合物を診断する方法であって、

a. 細胞表面に該ポリペプチドに対するレセプター（化合物の該レセプターへの結合に応じて、検出可能なシグナルを発することのできる第2成分と関与する）を発現する細胞を、該レセプターへの結合を可能とする条件下でスクリーンすべき化合物と接触させ；

b. 該化合物とレセプターとの相互反応より生じるシグナルの有無を検出することにより、該化合物がレセプターに結合し、そのレセプターを活性化するか阻害するかどうかを測定することからなる方法。

【請求項22】 化合物をCSBP $\beta$ と固定する方法であって、

a. 分析的に検出可能な試薬で標識化した既知のCSAIDを、CSAID/CSBP $\beta$ 複合体を形成するのに十分な条件下で、CSBP $\beta$ と接触させ；

b. 該複合体を固定すべき化合物を有してなる試料と接触させ；および

c. その複合体中の標識化CSAIDの量を変える該化合物の能力を検出することにより、該化合物をCSAIDと固定することからなる方法。

【請求項23】 CSBP $\beta$ が全細胞、サイトソル細胞フラクション、膜細胞フラクションからなる群より選択される形態であり、精製または一部精製された形態である請求項22記載の方法。

【請求項24】 化合物をCSAIDと固定する方法であって、

a. 可溶性サイトソルフラクションをCSBP $\beta$ を発現する細胞より形成させ；

b. 該フラクションを、CSAID/CSBP $\beta$ 複合体を形成するのに十分な条件下で、分析的に検出可能な試薬で標識化したCSAIDと接触させ；

c. 該複合体をCSAIDを含有する試料と接触させ；および

e. 標識化CSAID/CSBP $\beta$ 複合体中の試薬の減少量を測定することにより、CSAIDと検出すること

からなる方法。

【請求項25】 細胞がヒト単球である請求項24記載の方法。

【請求項26】 細胞が組換え宿主細胞である請求項24記載の方法。

【請求項27】 試薬が放射性標識である請求項24記載の方法。

【請求項28】 CSBP $\beta$ との結合能を有するリガンドの同定法であって、

a. CSBP $\beta$ を発現する組換え宿主細胞を、結合を可能とする条件下で同定すべきリガンドと接触させ、および

b. リガンド結合タンパク質の存在を検出することからなる方法。

【請求項29】 組換え宿主細胞がその細胞表面でCSBP $\beta$ を発現する請求項28記載の方法。

【請求項30】 タンパク質またはタンパク質含有の膜フラクションを、同定すべきリガンドと接触させる前に細胞より分離する請求項28記載の方法。

【請求項31】 請求項22記載の方法により同定されるアングゴニストまたはアゴニスト化合物。

【請求項32】 請求項22記載の方法により同定される化合物と、医薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項33】 請求項1記載のDNAを、そのいずれかの細胞にて発現する能力を有するヒト以外のトランスジェニック哺乳動物。

【請求項34】 ヒトCSBP $\beta$ に結合する化合物を同定するためのそれら化合物のスクリーニング方法であって、

a. CSBP $\beta$ 領域および結合タンパク質／リガンド結合インジケター領域を有する融合タンパク質を、CSBP $\beta$ 領域との結合を可能とする条件下で複数の化合物と接触させ、および

b. そのタンパク質／リガンド結合インジケター領域の活性を強化または阻害する能力を有する候補薬剤を同定することからなる方法。

【請求項35】 ヒトCSBP $\beta$ と結合し、そのキナーゼ活性を阻害する化合物を同定するためのそれら化合物のスクリーニング方法であって、

a. CSBP $\beta$ を、CSBP $\beta$ との結合を可能とする条件下で複数の化合物と接触させ、および

b. CSBP $\beta$ のキナーゼ活性を強化または阻害する能力を有する候補薬剤を同定することからなる方法。

【請求項36】 ヒトCSBP $\beta$ と結合し、そのキナーゼ活性の活性化を阻害する化合物を同定するためのそれら化合物のスクリーニング方法であって、

a. CSBP $\beta$ を、CSBP $\beta$ との結合を可能とする条件下で複数の化合物と接触させ、および

b. CSBP $\beta$ のキナーゼ活性の活性化を強化または阻

害する能力を有する候補薬剤を同定することからなる方法。

【請求項37】 サイトカイン介在の炎症疾患の治療法であって、CSBP $\beta$ -阻害量のCSAIDをその治療を必要とする患者に投与することからなる方法。

【請求項38】 疾患が、SDAT、MS、脳性マラリア、発作、脳外傷、脊髄損傷、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、ARDS、RA、OA、IBD、乾癬、皮膚炎、喘息、骨粗鬆症、敗血症、慢性腎不全、移植片拒絶反応、狼瘡、移植片対宿主疾患、AIDSおよびカヘキシーからなる群より選択される請求項35記載の方法。

【請求項39】 CSAIDがCSBP $\beta$ のキナーゼ活性を阻害する請求項35記載の方法。

【請求項40】 CSAIDがCSBP $\beta$ とその基質との結合を阻害する請求項35記載の方法。

【請求項41】 CSBP $\beta$ のキナーゼ活性および／またはCSBP $\beta$ とその基質との結合を阻害することにより機能するCSAID。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、1993年9月17日出願の米国特許出願番号08/123175の一部継続出願である、1994年5月31日出願の米国特許出願番号08/250975の一部継続出願である、1995年6月6日出願の米国特許出願番号08/468902の一部継続出願である。

【0002】

【発明の属する技術分野】本発明は、とりわけ、薬剤結合タンパク質、そのタンパク質をコードする遺伝子、および医薬をスクリーニングするためのアッセイおよび方法に関する。さらに詳しくは、本発明はサイトカイン抑制抗炎症薬 (Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug (CSAID)) 結合タンパク質 (CSBP $\beta$ )、そのタンパク質をコードする遺伝子およびこの薬理学的クラスの薬物の評価および特徴付けに有用なアッセイおよびスクリーンに関する。

【0003】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】サイトカインは炎症および他の免疫機能の間の細胞応答を制御するにおいて重要な役割を果たす。特に興味のあるサイトカインは、インターロイキン-1 (IL-1 $\alpha$ および $\beta$ ) および腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ および $\beta$ ) であり、それは炎症応答カスケードの初期工程に關する細胞内タンパク質である (Arai 他、Ann. Rev. Biochem. 59:783-836 (1990))。かくして、最近では、炎症性刺激にตอบสนองするIL-1およびTNFの産生を妨げようとする研究が実質的な範囲でなされている。ある治療方法は、転写および／または翻訳および／または分泌のレベルでIL-1およびTNFの産生を抑制するものである。ある種のポリジニルイミダゾールに關与する活性

は、「CSAID」またはCytokine Suppressing Anti-Inflammatory Drugsと称される一連の化合物に通じる。転写ではより小さな作用が観察され、他の工程での作用も除外できないが、これらの化合物は翻訳レベルで優先的にIL-1およびTNFの発現を阻止するようである。

【0004】ピリジニルイミダゾール、5-（4-ピリジル）-6-（4-フルオロフェニル）-2,3-ジヒドロイミダゾ（2,1-b）チアゾール（SK&F 86002）は原型CSAIDと同定された。その活性についての基本事項は確立され、特徴付けられている（Leeら, *Int'l J. Immunopharm.* 10 (7) : 835-843 (1989) ; *Agents and Actions* 27 (3/4) : 277-279 (1989) および *Int'l J. Immunother.* 6 (1) : 1-12 (1990)）。SARの研究は、ピリジニルイミダゾールのサイトカイン抑制作用が、エイコサノイドおよびロイコトリエン産生に対するその阻害作用とは独立した、独特な活性を示すことを示唆する。実質的にCSAIDが新規な抗炎症治療剤である可能性があるため、分子レベルでの作用機構を特徴付けること、ならびに高度な選択性および効能を有する化合物を得ることは非常に重要なことである。詳細には、CSAID分子標的の同定および特徴付けは、疾患に関与する生物学的工程の理解を深め、さらに強力な抗炎症薬の設計およびスクリーニングを助けるであろう。本発明は、とりわけ、さらなるCSAID結合タンパク質（CSBP）の精製および特徴付けを開示する。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本明細書に開示されている特定の配列などの、本発明のDNAは、そのDNAが新規なCSBPβの発現に必要な遺伝的情報をコードする点で有用である。加えて、該配列はCSBPβ科の別のメンバーを単離し、同定するためのプローブとして用いてもよく、ならびにCSBPβ遺伝子の非典型的な発現により特徴付けられる病態のアレンチセンス療法の基礎を形成する。新規なタンパク質それ自体は、直接、治療剤または診断剤として、ならびにCSAID結合活性のアントゴニストまたはアゴニストである化合物に対するスクリーニング系の成分として有用である。該タンパク質はまた、異種の種における抗体産生を惹起するのに有用であり、その抗体は前記した診断、治療およびスクリーニングに用いるのに有用である。本明細書に記載の試薬に関するこれらの使用および他の使用は、この明細書を読むことにより当業者に明らかとなるであろう。

#### 【0006】

【発明の実施の形態】図1ないし3に示されるポリヌクレオチド配列などの本明細書に示す情報を用いると、CSBPβをコードする本発明のポリヌクレオチドは、出発物質としての精製およびT細胞からのmRNAを用いてcDNAをクローニングする方法などの、標準的クロー

ニングおよびスクリーニング法を用いて得ることができる。本発明の代表例である、図1ないし3に示されるポリヌクレオチドの部分フラグメントは、発現配列タグ（EST）分析を用いてヒト精巣の細胞から由来のcDNAライブラリーにて見つけた（Adams, M. D. ら, *Science*, 252 : 1651-1656 (1991) ; Adams, M. D. ら, *Nature*, 355 : 632-634 (1992) ; Adams, M. D. ら, *Nature*, 377 Supp : 3-174 (1995)）。その後、図1ないし3の配列に対応し、表示されるようなタンパク質翻訳のための読み枠を有する長いcDNAを、活性化T細胞ライブラリーより標準的クローニングおよびスクリーニング操作を用いるハイブリダイゼーションを介してクローンした。本発明のCSBPβは、構造的に、CSBP科の他のタンパク質に関連付けられる。本発明のCSBPβをコードするヌクレオチド配列は、MAPキナーゼ科の他のヒトメンバーと、その全体にわたって、約58-73%の同一性を有する。

【0007】本発明のポリヌクレオチドは、mRNAのごときRNAの形態であってもよく、あるいは、例えばクローニングにより得られるか、または化学合成法もしくはその組み合わせにより産生されるcDNAおよびゲノムDNAを含め、DNAの形態であってもよい。DNAは2本鎖または1本鎖であってもよい。1本鎖DNAはセンス鎖としても知られているコーディング鎖であってもよく、または、アンチセンス鎖とも称される非コーディング鎖であってもよい。ポリペプチドをコードするコーディング配列は、図1ないし3（配列番号1）に示されるポリヌクレオチドのコーディング配列と同じであってもよい。そのコーディング配列はまた、遺伝暗号の重複性（縮重性）の結果として、図1ないし3（配列番号2）のポリペプチドをもコードする、別の配列を有するポリヌクレオチドであってもよい。

【0008】図1ないし3（配列番号2）のポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチド用のコーディング配列自体；成熟ポリペプチド用のコーディング配列および付加的なコーディング配列、例えば、プレー、ブローまたはプレブロータンパク質配列などのリーダー配列または分泌配列をコードする配列；および前記した付加的なコーディング配列を有するか、または有することなく、例えば、限定されるものではないが、転写およびスプライシングを含め、mRNAプロセッシングにて役割を果たす、転写かつ非翻訳の配列および、例えば、mRNAのリボソーム結合および安定性のためのポリアダニル化シグナルなどのイントロンおよび非コーディング5'および3'配列を包含する付加的な非コーディング配列を有する成熟ポリペプチドのコーディング配列を包含するが、これに限定されるものではない。付加的な官能性を付与するコーディング配列をポリペプチドに組み入れてもよい。かくして、例えば、ポリペプチドを、融合ポリペプチドの精製を容易に

する、ペプチドなどのマーカ配列に融合させてもよい。本発明のこの態様の特定の好ましい具体例において、マーカ配列は、pQEベクター (Qiagen, Inc.) で供給されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドである。Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 821-824

(1989)に記載されているように、例えば、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質を精製するのに都合がよい。別の具体例において、マーカ配列はHAタグである。そのHAタグはインフルエンザ・赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応するものであり、例えば、Wilsomら、Cell 37: 767 (1984)に記載されている。他の多くのそのようなタグが市販されている。

【0009】前記によれば、本明細書にて用いられる「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」なる語はまた、コーディングおよび/または非コーディング配列を含んでいてもよい、付加的な領域と共に、該ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域

(例えば、イントロンにより分断されている)を含むポリヌクレオチドも包含する。さらに本発明は、図1ないし3 (配列番号2) の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体をコードするポリヌクレオチドの変種に関する。ポリヌクレオチドの変種は、天然の対立遺伝子変種などの天然に存在する変種であってもよく、あるいは、天然に存在することが知られていない変種であってもよい。かかるポリヌクレオチドの天然に存在しない変種は、ポリヌクレオチド、細胞または生物に用いる方法を含め、突然変異誘発法により製造してもよい。

【0010】この点で変種には、ヌクレオチド置換、欠失または付加により前記したポリヌクレオチドと異なる変種がある。置換、欠失または付加には1個またはそれ以上のヌクレオチドが関与しているかもしれない。変種は、コーディング配列または非コーディング配列あるいはそれらの両方において変化していてもよい。コーディング配列の変化により、同義または非同義アミノ酸置換、欠失または付加が生じてよい。この点で本発明の特に好ましい具体例には、図1ないし3 (配列番号2) に示されるCSBPβのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド; その変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびにその変種、アナログおよび誘導体のフラグメントがある。

【0011】さらには、数個、わずかな、5ないし10、1ないし5、1ないし3、2、1個または0個のアミノ酸残基が、いずれかの組み合わせで置換、欠失または付加されている、図1ないし3 (配列番号2) のCSBPβポリペプチドのアミノ酸配列を有する、CSBPβ変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびにそのフラグメントの変種、アナログおよび誘導体をコードするポリヌクレオチドが特に好ましい。これらのうち特に好ましいのは、CSBPβの特性および活性を改

化させないサイレント置換、付加および欠失である。またこの点において、同義置換が特に好ましい。置換されていない、図1ないし3 (配列番号2) のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが最も好ましい。

【0012】本発明のさらに好ましい具体例は、図1ないし3に示されるアミノ酸配列を有するCSBPβポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して少なくとも75%の同一性を有するポリヌクレオチド、およびかかるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドである。寄託クローンのヒトcDNAのCSBPβポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびそれに相補的なポリヌクレオチドに対して少なくとも80%同一である領域からなるポリヌクレオチドが非常に好ましい。この点において、そのポリペプチドに対して少なくとも90%同一であるポリヌクレオチドが特に好ましく、特に好ましいのは、少なくとも95%同一のものである。さらには、少なくとも97%同一のものが非常に好ましく、少なくとも98-99%同一のものがさらに好ましく、少なくとも99%同一のものが最も好ましい。この点において、さらに特に好ましい具体例は、図1ないし3 (配列番号2) のcDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドである。

【0013】本発明はさらに本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチドに関する。この点において、本発明は、特に、ストリンジェントな条件下、本明細書にて前記したポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチドに関する。本明細書にて用いる「ストリンジェントな条件」なる語は、ハイブリッド形成が、配列間で少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%同一である場合にのみ生じることを意味する。本発明のポリヌクレオチドは、成熟タンパク質に、付加的なアミノまたはカルボキシル末端アミノ酸が加わるか、成熟ポリペプチドの内部にアミノ酸が加わった (例えば、成熟形態が一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合) ポリペプチドをコードすることができる。このような配列は、とりわけ、前駆体から成熟形態へのタンパク質のプロセッシングにおいて役割を果たし、タンパク質を運ぶことを容易にし、タンパク質の半減期を長くしたり、短くしたり、あるいはアクセシまたは生産のためのタンパク質の操作を容易にすることができる。インンテューで一般的なように、該付加アミノ酸は細胞酵素により成熟タンパク質からプロセッシングにより除かれる。

【0014】一またはそれ以上のプロ配列に融合したポリペプチドの成熟形態を有する前駆体タンパク質は該ポリペプチドの不活性形でもよい。プロ配列が除かれると、そのような不活性前駆体は一般に活性化される。プ

ロ配列の幾らかまたは全体を、活性化の前に除去できる。一般に、そのような前駆体はプロタンパク質と称される。総じて、本発明のポリヌクレオチドは成熟タンパク質、リーダー配列の加わった成熟タンパク質（プレタンパク質とも称される）、プレタンパク質のリーダー配列ではない1またはそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体。またはリーダー配列と、一般に、ポリペプチドの活性な成熟形態を生成するプロセッシング工程の間に除去される1またはそれ以上のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレプロタンパク質をコードする。

#### 【0015】ポリペプチド

本発明は、さらに図1ないし3（配列番号2）の推定アミノ酸配列を有するCSBP $\beta$ ポリペプチドに関する。本発明はまた、これらのポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体にも関する。「フラグメント」、「誘導体」および「アナログ」なる語は、図1ないし3のポリペプチドについて言う場合、かかるポリペプチドと実質的に同じ生物学的機能または活性を保持している、すなわち、CSBP $\beta$ として機能するポリペプチド、または、たとえそのポリペプチドがCSBP $\beta$ として機能しなくてもそのリガンドまたは結合分子に結合する能力を保持している、ポリペプチドを意味する。かくして、アナログは、例えば、プロタンパク質部分の開裂により活性化され、活性成熟ポリペプチドを産生しうるプロタンパク質を包含する。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチドであってもよい。特定の好ましい具体例において、本発明のポリペプチドは組換えポリペプチドである。

【0016】図1ないし3（配列番号2）のポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログは、(i) 1個またはそれ以上のアミノ酸残基が保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは、保存アミノ酸残基）で置換されており、かかる置換アミノ酸残基は遺伝暗号によりコードされているものであっても、なくてもよいもの；

(ii) 1個またはそれ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの；(iii) 成熟ポリペプチドが別の化合物、例えば、ポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）と融合しているもの；または(iv) リーダーもしくは分泌配列または成熟ポリペプチドの精製用に利用される配列またはプロタンパク質配列などの、付加的なアミノ酸が成熟ポリペプチドに融合しているものであってもよい。かかるフラグメント、誘導体およびアナログは、本明細書の教示から当業者に自明であると考えられる。この点において、本発明の特に好ましい具体例には、図1ないし3（配列番号2）に示されるCSBP $\beta$ のアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびに該フラグメントの変種、アナログおよび

誘導体である。さらに、この点において本発明の特に好ましい具体例は、CSBP $\beta$ のアミノ酸配列を有するポリペプチド、その変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびにCSBP $\beta$ 結合活性/CSBP $\beta$ の機能を保持しているフラグメントの変種、アナログおよび誘導体である。

【0017】さらにこの点において特に好ましいのは、数個、わずかな、5ないし10、1ないし5、1ないし3、2、1個または0個のアミノ酸残基が、いずれかの組み合わせで置換、欠失または付加されている、図1ないし3のCSBP $\beta$ ポリペプチドのアミノ酸配列を有する変種、アナログ、誘導体およびフラグメント、ならびに該フラグメントの変種、アナログおよび誘導体である。これらのうち特に好ましいのは、CSBP $\beta$ の性質および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。またこの点において、同類置換が特に好ましい。最も好ましいのは、置換されていない図1ないし3のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0018】本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは、単離形態にて提供され、好ましくは、等質性になるまで精製される。本発明のポリペプチドは、配列番号2のポリペプチド（詳細には成熟ポリペプチド）、ならびに配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも80%の同一性を有し、より好ましくは配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも90%の類似性（より好ましくは少なくとも90%の同一性）を有し、さらにより好ましくは配列番号2のポリペプチドに対して少なくとも95%の類似性（さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性）を有するポリペプチドを包含する。また、一般に、少なくとも30個のアミノ酸、好ましくは少なくとも50個のアミノ酸を含有するポリペプチドの部分を含むそのようなポリペプチドの部分を含む。

#### 【0019】ポリペプチドフラグメント

本発明のポリペプチドのフラグメントまたは部分を、ペプチド合成により対応する完全長のポリペプチドの製造に使用してもよい；従って、フラグメントを完全長のポリペプチドの製造のための中間体として使用してもよい。本発明のポリヌクレオチドのフラグメントまたは部分を用いて本発明の完全長のポリヌクレオチドを合成してもよい。フラグメントは、「自立している」、すなわち、他のアミノ酸またはポリペプチドの一部でなく、または、それらに融合しておらず、あるいは、かかるフラグメントが大きなポリペプチド中に含まれていてその一部分または領域となっていてよい。大きなポリペプチド中に含まれている場合、このフラグメントは、最も好ましくは単一の連続した領域を形成する。しかしながら、いくつかのフラグメントが、単一のより大きなポリペプチド中に含まれていてもよい。例えば、特定の好ましい具体例は、宿主中での発現のために設計された前駆

体ポリペプチド中に含まれていて、CSBP $\beta$ フラグメントのアミノ末端に融合した異種プレおよびブローポリペプチド領域、および、該フラグメントのカルボキシル末端に融合した付加的な領域を有している。本発明のCSBP $\beta$ ポリペプチドのフラグメントに関する。従って、本明細書の意図する1つの態様において、フラグメントは、CSBP $\beta$ から由来の融合ポリペプチドまたは融合タンパク質の一部または部分をいう。

【0020】本発明のポリペプチドフラグメントの典型例として、長さが約5ないし15個、10ないし20個、15ないし40個、30ないし55個、41ないし75個、41ないし80個、41ないし90個、50ないし100個、75ないし100個、90ないし115個、100ないし125個、および110ないし113個のアミノ酸のものを挙げることができる。この意味において、「約」とは、特に列挙した範囲、ならびに数値、わずかな、5、4、3、2、1個のアミノ酸残基の分だけ大きいまたは小さい範囲であって、上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲を包含する。例えば、この意味においては、約40ないし90個のアミノ酸は、40プラスまたはマイナス数個、わずかな、5、4、3、2、1個のアミノ酸残基から、90プラスまたはマイナス数個、わずかな、5、4、3、2、1個のアミノ酸残基までのポリペプチドフラグメントを意味し、すなわち、最大40マイナス数個のアミノ酸から90プラス数個のアミノ酸、最小40プラス数個のアミノ酸から90マイナス数個のアミノ酸の範囲である。この点において好ましくは、上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲において、列挙した範囲プラスまたはマイナス5個程度のアミノ酸である。上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲において、列挙した範囲プラスまたはマイナス3個程度のアミノ酸が特に非常に好ましい。上限または下限、あるいはそれらの両方の範囲において、列挙した範囲プラスまたはマイナス1個程度のアミノ酸、または列挙した範囲に付加または欠失のないものが特に非常に好ましい。この点において、約5ないし16個、10ないし20個、15ないし40個、30ないし55個、41ないし75個、41ないし80個、41ないし90個、50ないし100個、75ないし100個、90ないし115個、100ないし125個、および110ないし113個のアミノ酸の長さのフラグメントが、すべてのうちで最も好ましい。

【0021】本発明の特に好ましい具体例には、CSBP $\beta$ の平滑末端の変異体がある。平滑末端の変異体は、アミノ末端を含む連続した一連の残基（すなわち、連続領域、一部または部分）またはカルボキシル末端を含む連続した一連の残基の欠失、あるいは両平滑末端の変異体のような、2つの連続した一連の残基の欠失、すなわち、アミノ末端における欠失およびカルボキシル末端における欠失を除く、図1ないし3（配列番号2）のアミ

ノ酸配列を有するCSBP $\beta$ ポリペプチド、またはその変種または誘導体を包含する。本発明の誘導体レセプターの特に好ましいフラグメントとして、付随するトランスメンブランのない細胞外ドメインからなる可溶性のレセプターが挙げられ、細胞質ドメインまたはトランスメンブラン領域が欠失していることで、細胞外ドメインを細胞質ドメインに直接融合させるレセプターが得られる。する。例えば、PCT公開番号WO94/03620を参照のこと。前記した範囲の大きさを有するフラグメントもまた平滑末端フラグメントの好ましい具体例であり、フラグメントのうちそのフラグメントが特に好ましい。

【0022】本発明のこの態様において、CSBP $\beta$ の構造的または機能的属性によって特徴づけられるフラグメントも好ましい。この点において本発明の好ましい具体例は、CSBP $\beta$ のアルファヘリックスおよびアルファヘリックス形成領域（「アルファ領域」）、ベータターンシートおよびベータターンシート形成領域（「ベータ領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水領域、疎水領域、アルファ両親水性領域、ベータ両親水性領域、可動性領域、界面形成領域および高抗原性指数領域を含んでなるフラグメントを包含する。

【0023】この点において、非常に好ましい具体例には、いくつかの構造特性、例えば、前記した特性のいくつかを組み合わせたCSBP $\beta$ の領域からなるものがある。この点において、図1ないし3の約10ないし約20、約40ないし約50、約70ないし約90および約100ないし約113の残基によって限定される領域が特に好ましい領域であり、そのすべては、ターン領域、親水領域、可動性領域、界面形成領域および高抗原性指数領域の高度に特徴的なアミノ酸組成物によって特徴づけられる。かかる領域はより大きなポリペプチド中に含まれていてもよく、あるいは前記のごとくそれら自体本発明の好ましいフラグメントであってもよい。このパラグラフにて用いる「約」なる語は、一般に、フラグメントに関して前記した意味を有することが理解されよう。

【0024】さらに好ましい領域はCSBP $\beta$ の活性を媒介する領域である。この点において、類似活性または改善された活性を有するものまたは望ましくない活性の減少したものを含め、CSBP $\beta$ の化学的、生物学的活性または他の活性を有するフラグメントが最も好ましい。この点において、関連するポリペプチドの活性領域に対して配列または位置、あるいは両方が相同的である領域を含むフラグメントが非常に好ましい。本発明はまた、とりわけ、前記したフラグメントをコードするポリヌクレオチド、該フラグメントをコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチド、特にストリンジェントな条件下でハイブリッド形成するも

の、および該フラグメントをコードするポリヌクレオチドを増幅するためのPCRプライマーなどのポリヌクレオチドに関する。これらの点において、好ましいポリヌクレオチドは、前記のような好ましいフラグメントに対応するポリヌクレオチドである。

#### 【0025】ベクター、宿主細胞、発現

本発明のタンパク質は、組換え遺伝子工学技法により製造されるのが好ましい。DNAを遺伝子発現に要求される必須の発現調節領域（例えば、調節領域）に機能的に連結させることにより、単離した核酸、好ましくは、DNAを発現ベクターに導入することができる。ベクターは、当該分野にて周知の方法（Ausubelら、前掲）により、原核生物（例えば、細菌）または真核生物（例えば、酵母または哺乳動物）細胞などの適当な宿主細胞に導入することができる。製造または単離した所望のタンパク質についてのコーディング配列をいずれか適当なベクターまたはレプリコンにクローンすることができる。多くのクローニングベクターが知られており、問題は適当なクローニングベクターを選択することである。クローニング用組換えDNAベクターおよび該ベクターが形質転換できる宿主細胞は、バクテリオファージλ（E. coli）、pBR（E. coli）、pACYC177（E. coli）、pKT230（グラム陰性菌）、pGV1106（グラム陰性菌）、pLAFR1（グラム陰性菌）、pME290（非-E. coliグラム陰性菌）、pHV14（E. coliおよびBacillus subtilis）、pBD9（Bacillus）、pU61（Streptomyces）、pUC6（Streptomyces）、Ylp5（Saccharomyces）、バキアロウイルス昆虫細胞系、YCP19（Saccharomyces）を包含する。一般には、「DNA Cloning: Vols. I & II, 61 36 overら編、IRL Press Oxford (1985) (1987) および T. Maniatisら、[Molecular Cloning], Cold Spring Harbor Laboratory (1982) を参照のこと。

【0026】遺伝子は、所望のタンパク質をコードするDNA配列がこの発現構築物を含有するベクターにより形質転換される宿主細胞のRNA中に転写されるように、プロモーター、リボソーム結合部位（細菌発現用）および所望によりオペレーター（包括的に本明細書にて「制御 (control)」因子と称される）の制御下に置くことができる。コーディング配列はシグナルペプチドまたはリーダー配列を有していてもいなくてもよい。本発明のサブユニット抗原は、例えば、E. coli lacプロモーターまたはタンパク質A遺伝子 (spa) プロモーターおよびシグナル配列を用いて発現させることができる。リーダー配列は、細菌宿主により翻訳後プロセッシングにより除去することができる。例えば、米国特許第4431739号；第4425437号；第4338397号を参照のこと。

【0027】制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に関連してタンパク質配列の発現を調節することのできる調節配列を加えることが望ましい。調節配列は当業者に知ら

れており、例えば、調節化合物の存在を含め、化学的または物理的刺激にตอบสนองしてターンオンまたはオフされるように遺伝子の発現を引き起こすものが挙げられる。別の型の調節因子、例えば、エンハンサー配列もまた、ベクター中にあってもよい。

【0028】発現ベクターは特定のコーディング配列が適当な調節配列を有するベクター中に配置されるように構築される。コーディング配列が制御配列の「制御」下で転写されるように、制御配列に関してそのコーディング配列を位置付けかつ配向させる（すなわち、制御配列のDNA分子に結合するRNAポリメラーゼがコーディング配列を転写する）。目的とする特定のタンパク質をコードする配列を修飾することがこの目的を達成するのに望ましいかもしれない。例えば、ある場合には、すなわち、読み枠を維持するために、適当な配向を有する制御配列に結合するように配列を修飾する必要があるかもしれない。前記したクローニングベクターなどのベクターに挿入する前に、制御配列および他の調節配列をコーディング配列にライゲートすることもできる。別法として、既に制御配列および適当な制限部位を有する発現ベクターに直接的にそのコーディング配列をクローン化させることもできる。

【0029】ある場合には、ポリペプチドを宿主生物から分泌させ、つづいて分泌シグナルの切断を生じさせる配列を加えることが望ましい。別法として、遺伝子融合を、目的とする結合タンパク質をコードする遺伝子を他の所望の特性を有する産物をコードする遺伝子に融合させることで形成させてもよい。例えば、融合対は、結合タンパク質を選択する別の手段として用いることのできる公知のアッセイ可能な活性（例えば、酵素活性）を付与することができる。結合タンパク質（一般に、サイトゾル成分）を細胞表面に融合タンパク質の形態で表すことができるように、融合対は細胞表面因子などの構造因子とすることができる。また、その融合対は、特異的抗体および試薬で検出でき、精製の補助剤として作用してもよい。ペプチドまたはタンパク質フラグメントとすることもできる（例えば、His尾部、グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合）。目的とするタンパク質の変異体またはアナログを産生することも望ましい。変異体またはアナログは、タンパク質をコードする配列の一部の欠失により、一の配列の挿入により、および/またはその配列内での1またはそれ以上のヌクレオチドの置換により製造できる。部位定方向突然変異誘発などのヌクレオチド配列を修飾する技法および融合タンパク質を形成する方法は当業者に周知である。例えば、T. Maniatisら、前掲；DNA Cloning, Vols. I および II, 前掲；Nucleic Acid Hybridization, 前掲を参照のこと。

【0030】多数の原核細胞発現ベクターが当該分野にて知られている。例えば、米国特許第4578355号；第4440859号；第4436815号；第4431740号；第4431739号；第4

428941号;第4425437号;第4418149号;第4411994号;第4356246号;第4342832号を参照;さらに、英国特許出願GB2121054;GB2008123;GB2007676;および欧州特許出願103395を参照のこと。酵母発現ベクターも知られている。例えば、米国特許第4446235号;第4443539号;第4430428号を参照;さらに、欧州特許出願103409;100561;96491を参照のこと。SV40後期プロモーターを用いて哺乳動物細胞にて発現を起こさせるpSV2neo(J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341に記載)またはpCDNA1neo、CMVプロモーターを用いて発現を起こさせるpCDNA1より由来のベクター(Mol. Cell Biol. 7:4125-29)。これら後者の2つのベクターを哺乳動物細胞における一時的または安定的(例えば、G418またはヒドロマイシン耐性を用いて)発現に用いることができる。昆虫細胞発現系、例えば、Drosophila(例えば、PCT出願US89/05155およびUS91/06838ならびにEP出願88/304093、3を参照のこと)およびバキュロウイルス発現系も有用である。

【0031】選択した発現系および宿主に応じて、前記した発現系により形質転換された宿主細胞を目的とするタンパク質を発現させる条件下で増殖させることで本発明のタンパク質を産生する。ついで、該タンパク質を宿主細胞より単離して精製する。発現系がタンパク質を増殖増地に分泌するならば、タンパク質はその増地より直接精製することができる。タンパク質が分泌されないならば、細胞ライゼートより単離するか、または細胞膜フラクションより回収される。適当な培養条件および回収方法の選択は当業者の範囲内である。

【0032】本発明のタンパク質を同定する別法は、遺伝子ライブラリーを構築し、その得られたクローンを用いてE.coliを形質転換させ、プールし、所望の結合タンパク質に対するポリクローナル血清またはモノクローナル抗体を用いて個々のコロニーをスクリーニングすることによる。本発明のタンパク質はまた、公知アミノ酸配列または目的とする遺伝子のDNA配列から由来のアミノ酸配列を用いて、固相ペプチド合成などの化学合成により産生することもできる。かかる方法は当業者に知られている。特に、ペプチドの化学合成は好ましくはない。

【0033】アッセイ本発明はまた、CSBPβに結合することが知られていないリガンドがそのようなタンパク質に結合することができるかどうかを測定する方法を提供するものである。該方法は、同定すべきリガンドを哺乳動物細胞からのサイトゾルフラクションと接触させ、CSAID結合アッセイ(Leeら、Nature 372:739-746;および以前のCSBPファイリング)にて、既知の放射性CSAIDと競合するその能力を測定することからなる。別法は、同定すべきリガンドを、かかるレセプターに結合すると前に同定されたリガンドと結合する

のに十分な条件下で、CSBPβのコーディング配列を発現する全細胞と接触させることからなる。他の具体例において、細胞膜あるいはCSBPβ融合体または単離した遊離もしくは固体支持体に固定したCSBPβを有するサイトゾルフラクションを用いて試験すべきリガンドの結合能を測定することもできる。CSBPβを発現させる目的に組換え細胞を用いる場合、あるとしても結合が目的とする発現タンパク質の存在に起因するようには、内因的CSBPβ活性のほとんどないまたは全くない細胞を用いることが好ましい。また、CSBPβを、結合に寄与するかもしれない内因性細胞タンパク質から分離できるペプチドまたはタンパク質フラグメントとの融合体として設計する。前記したように、特異的に設計されたレセプター結合のインヒビターを構築することができる。例えば、融合タンパク質は本発明のCSBPβをCSBPβ/リガンド結合に感受的なタンパク質ドメインと融合させることで製造できる。本明細書でインヒビタードメインと称されるそのようなドメインは、それ自身で、または補助分子と一緒に、レセプター・リガンド結合を指示する分析的に検出できるシグナルを発する能力を有する。この方法の変法は、CSBPβをTHP、1または他の哺乳動物細胞にて融合タンパク質(例えば、FLAGペプチドと融合した)として発現させ、THP、1細胞を適当に刺激し、前処理した後、その融合ペプチドを組換えCSBPβを刺激する手段として用いることである。かかる発現は、ウイルスプロモーター、例えば、CMV、RSVおよびポリアデニル化配列、et. SV40、ウシ成長ホルモンおよびG418などの選択可能なマーカーまたは安定したトランスフェクタントを選択するためのヒドロマイシンを利用する多くの哺乳動物発現ベクターで達成することができる。

【0034】そのような融合体を発現するトランスフェクションまたは形質転換した細胞からのサイトゾル調製物を利用してよい。リガンドを同定するのに有用な前記した技法はすべて、薬物スクリーニングおよび薬物開発プロトコルにおいても有用である。

【0035】また、SB202190または関連する化合物との競合結合アッセイにおいて、粗製THP、1細胞ライゼートの代わりに精製した組換えタンパク質を用いることもできる(Leeら、Nature 372:739-746)。このアッセイはCSBPβと結合する新規化合物についてスクリーニングするのに、あるいは結合することがわかっている化合物の変化を評価する方法として有用である。精製したタンパク質の有効性は粗製材料について前記したアッセイから選択的にアッセイを設定できることである。例えば、タンパク質が、比色定量アッセイにおける設定のためのタンパク質結合部位などのタグ、例えば、複合抗体に、または酵素活性を直接検出するための酵素、例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼもしくはアルカリ性ホスファターゼに共有結合するとす

れば、固体マトリックス上に見られる新規な化合物への結合が検出できる。かかる化合物は低分子量有機分子、ペプチド、ペプチドおよびタンパク質を包含し得る。後者においては、該タンパク質を、そのシグナル化カスケードにおける他のタンパク質、例えば、活性化単球におけるサイトカイン翻訳の活性化についての経路にあるものを単離する方法として用いることができる。また、CSAID結合機構により作用する哺乳動物細胞内にある天然の調節分子を単離するのに該タンパク質を用いてもよい。最後に、該タンパク質を用いてファージ表面に見られる標的ペプチドを同定することができる。

【0036】CSBP $\beta$ がタンパク質キナーゼをコードするという理解は、組換え形態を用いてタンパク質キナーゼ活性を確立することができることを示唆する。典型的には、これはCSBP $\beta$ を $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPの存在下でタンパク質またはペプチド基質と共に直接インキュベートし、つづいて分離し、計数することにより基質中に取り込まれた放射性活性を測定することからなる。分離法は、免疫沈降法、基質と遠心分離により分離させたビーズとの結合操作またはシンチレーション近接アッセイによる取り込み量の測定、SDS-PAGEつづいてオートラジオグラフィまたはバイオセンサー分析を包含する。特異的な基質はいまなおわかっていないが、候補基質として、CSBP $\beta$ それ自体（オートリン酸化）、ミエリン塩基性タンパク質、ATF2、MAPKAPキナーゼ2、MAPKAPキナーゼ3 (McLaughlinら、J. Biol. Chem. 271: 8488-8492 (1996) およびその中の引用文献) および公知MAPキナーゼ基質に関連するペプチドが挙げられる。他の基質は、CSBP $\beta$ を、固体支持体に結合するかまたはファージに見られる（上記参照）無作為なペプチドとインキュベートすることにより、またはCSBP $\beta$ を哺乳動物細胞ライゼート（例えば、THP-1細胞ライゼート）および $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPと一緒にインキュベートし、つづいて標識化標的タンパク質を分離し、配列決定することにより判明するかもしれない。キナーゼ活性はまた、アンチホスホチロシン抗体を用いることで検出される。CSBP $\beta$ のタンパク質キナーゼ活性は特異的MAPキナーゼとのインキュベートを必要とするかもしれない。これはCSBP $\beta$ を刺激した真核細胞（例えば、LPS処理THP-1細胞）からのライゼートおよびATPとブレインキュベートに付すことで産成できる。別法として、高容量オスモル濃度条件にて増殖させた、ヒトCSBP $\beta$ を発現する酵母のHOG1欠失株からより活性な形態のCSBP $\beta$ を単離することも可能である（例えば、Kumarら、J. Biol. Chem. 270: 29043-29046 (1995) を参照のこと）。

【0037】これらのアッセイで、インビトロにおけるCSBP $\beta$ キナーゼ活性、CSAIDSの公知特性を阻害する化合物を発見し、修飾することができる（Leeら、Nature、前期）。かかる化合物は前記した化合物と

の比較方法でサイトカイン合成を遮断するであろう。その化合物はまた、それ自身がサイトカイン生成を遮断する新規な化合物を発見するための実現可能な標的である新規な基質の発見をもたらさう。

【0038】他のMAPキナーゼと同様、CSBP $\beta$ はMAPキナーゼキナーゼにより活性化され、したがって組換えタンパク質はCSBP $\beta$ のMAPキナーゼキナーゼと推定されるものでリン酸化される能力を測定する第2アッセイを確立させると考えられる。この場合、刺激細胞ライゼートからのフラクション（例えば、LPSで刺激したTHP-1細胞）を、 $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPの存在下でCSBP $\beta$ とインキュベートし、 $^{32}$ P-標識のCSBP $\beta$ への取り込み量を分離および計数により測定する。分離は多くの方法で行うことができる：一の方法は、ペプチドまたはタンパク質に融合したCSBP $\beta$ を用い、そのペプチドまたはタンパク質依存性抗体とのアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降を介して分離することにある。別法として、CSBP $\beta$ をビーズに直接接合させるか、または融合ペプチドまたはタンパク質（例えば、FLAG（ペプチド）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）を介して結合させ、細胞ライゼートとインキュベートした後で遠心分離により分離することもできる。さらに、CSBP $\beta$ のチロシンリン酸化は市販されている抗ホスホチロシン抗体を用いる免疫沈降またはイムノプロットで検出できる。

【0039】これらのアッセイを用いてCSBP $\beta$ キナーゼ活性の活性化を遮断する化合物を見つけ出すこと、既に発見されている化合物の効能を改良することができる。これら化合物はサイトカイン合成を遮断することにより有用性があると考えられる。ヒトCSBP $\beta$ は高容量オスモル濃度条件下で増殖させたHOG1欠失株を救う能力を有するため、インビトロにおけるCSBP $\beta$ 活性を遮断する化合物を直接スクリーニングすることができる。例えば、化合物は高容量オスモル濃度にてCSBP $\beta$ +HOG1-酵母株の増殖を遮断するその能力についてスクリーニングすることができるが、標準的な容量オスモル濃度での同じ株または高容量オスモル濃度でのCSBP $\beta$ -HOG1+株での増殖については効果が無い。酵母をベースとするアッセイの感度は、細胞膜および透過性に影響を及ぼす宿主変異を導入することにより増大させることができる（Gaberら、Mol. Cell Biol. 9: 3447-3456 (1989)）。

【0040】本発明の化合物をスクリーニングする場合において、単離した形態、固定した形態または細胞結合した形態のCSBP $\beta$ を複製の候補分子と接触させ、そのタンパク質と結合し、かつ相互反応する候補分子を選抜する。結合または相互反応は、目的とする放射性活性標識した候補分子を用いることで直接的に、または候補化合物の相互反応または結合の結果得られる効果を測定することにより間接的に測定できる。また、候補化合物

を競合スクリーニングアッセイ。すなわち、好ましくは分析して検出可能な試薬、最適には放射性活性で標識した公知のリガンドを試験すべき化合物と一緒に導入し、その標識したリガンドの結合を阻害または亢進する化合物の能力を測定するアッセイに付すことができる。CSBPβとのアフィニティーおよび選択性の増加について化合物をスクリーニングする。

【0041】本発明のこの態様を明らかにするために、天然物のスクリーンを行ってもよい。ミニカラムを用いる排除クロマトグラフィーにより結合リガンドを遊離リガンドから分離する標準アッセイを用いて、スクリーニング操作を開始する。海洋抽出物、微生物抽出物および植物抽出物をTHP、1サイトゾルとのH-CSAID結合の阻害について試験する。結合が約80-200 μg/mlのIC<sub>50</sub>で特徴付けられれば、抽出物はアンタゴニストと確認される。選択された一群のいずれかの「抑制 (nuisance) 抽出物」による阻害を観察することができないことと関連してヒット率が低いことは、該アッセイがスクリーニング操作を支持するのに十分に選択的かつ効果的であることを示唆する。前処理スクリーニング能を容易にする結合アッセイのさらなる改良はスピンカラムを用いて遊離リガンドから結合リガンドを分離するマイナーな修飾により達成することができる。

#### 【0042】阻害剤

本発明のCSBPβがセリン-トレオニンタンパク質キナーゼのCSBP-MAPキナーゼ種に相同的であるという知見により、広範囲に及ぶ急性および慢性炎症疾患を治療するための理論的根拠が得られる。従って、サイトカイン介在疾患を患っている患者をCSBPβ阻害量のCSAIDで治療することも本発明のさらなる態様である。かかる疾患の代表例として、アルツハイマー型の老人性痴呆症 (SDAT)、多発性硬化症、脳性マラリア、発作、脳外傷および育脳障害などの中枢神経系に付随する疾患；再狭窄およびアテローム性動脈硬化症などの心臓血管疾患；成人呼吸器症候群 (ARDS)、慢性リウマチ関節症、変形性関節症、炎症性腸疾患 (IBD)、乾癬、皮膚炎、喘息などの炎症疾患；および骨折癒合症、外科的または外傷的インシデントによる敗血症、慢性腎不全、AIDS、カヘキシーおよび自己免疫疾患、例えば、エリトマトーデス、宿主移植片拒絶反応および移植片対宿主疾患などの異常機能または過剰サイトカインに伴う疾患または症状が挙げられるが、これに限定されるものではない。かくして、本発明は、CSBPβ阻害量の化合物を投与することによりかかる疾患を治療および/または改善することを意図とする。本発明のCSBPβの機能に関する理論に拘束されることなく、CSBPβ機能を阻害する有用なものには、CSBPβのキナーゼ活性を阻害する化合物があると考えられる。他の阻害部位が、もちろん、シグナルトランスダクションカスケードにあるとの立場を取ることも可能であ

る。したがって、CSBPβとその上流または下流にある1またはそれ以上の基質との相互作用を阻害することも本発明の意図するところである。

#### 【0043】組成物/投与

本発明はまた、前記した方法により固定した化合物と、医薬上許容される担体とからなる医薬組成物を意図する。本発明のタンパク質様薬物の医薬組成物は、特に、非経口投与、すなわち、皮下投与、筋肉内投与または静脈内投与に有用である。非経口投与用組成物は、一般に、許容される担体、好ましくは水性担体に溶かした本発明の化合物の溶液またはそのカクテルからなる。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、0.4%食塩水、0.3%グリシンなどを用いることができる。これらの溶液は滅菌されており、粒状物のないのが一般的である。これらの溶液は慣用的な周知の滅菌技法により滅菌処理することができる。組成物は、要すれば、適当な生理学的条件まで、pH調節および緩衝剤などの医薬上許容される補助物質を含んでいてもよい。そのような医薬組成物における本発明の化合物の濃度は極めて広く、すなわち、約0.5重量%以下から、通常、または少なくとも1重量%、15または20重量%と同じ量まで変化させることができ、選択される個々の投与経路に従って、主に流体容量、粘度などに基づいて選択される。

【0044】かくして、筋肉内注射の場合の医薬組成物は1mLの滅菌緩衝水および50mgの化合物を含有するように調製できる。同様に、静脈内注入の場合の医薬組成物は250mLの滅菌リンガー (ringer) 溶液および150mgの化合物を含有するように調製できる。非経口投与可能な組成物の製法は周知であるか、または当業者にとっては自明であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvaniaにてさらに詳細に記載されている。本明細書に記載の化合物は貯蔵のために凍結乾燥させ、使用前に適当な担体で復元することができる。通常のタンパク質でこの方法が効果的であることがわかっており、当該分野にて公知の凍結乾燥法および復元法を用いることができる。

【0045】固定される薬物が非タンパク質様である場合には、それは単独でまたは医薬上許容される担体と組み合わせて投与できる。その割合は、化合物の溶解度および化学特性、選択される投与経路および標準的製薬慣習により決定される。例えば、澱粉、乳糖、特定の種類のクレイなどの賦形剤を含有する錠剤またはカプセルの形態にて経口投与してもよい。活性成分をシロップおよびコーンのシロップ、フレーバー剤および染料と混合し、ついで十分に脱水し、固体形に打錠するのに適するようにしたトローチまたはロゼンジの形態にて舌下投与してもよい。非経口的に、すなわち、筋肉内、静脈内または皮下的に注射してもよい溶液の形態にて経口投与してもよい。非経口投与する場合、他の成分、例えば滅菌溶液

を等価にするのに十分な食塩水またはグルコースを含有する溶液の形態にて用いることができる。

【0046】顧問医は最適と思われる治療薬の量を決定する。その量は投与形および選択される個々の化合物で変化し、さらには治療される個々の患者で変化するのである。顧問医は、一般に、最適薬よりも実質的に少ない量の化合物で治療を開始し、その状況下で最適効果が得られるまで用量を少量ずつ増加させるであろう。一般に、組成物を経口投与すると、非経口投与と同じ効果を得るのにより多量の活性剤が必要とされるであろう。該化合物は他のセロトニン系（serotonergic）剤と同じ方法にて有用であり、その投与量レベルはこれらの他の治療剤で通常用いられるのと同じ大きさである。治療用量は、一般に、一日当たり1ないし10mgまたはそれ以上であるが、数個の異なる投与単位を投与してもよい。0.5ないし10mgの活性剤を含有する錠剤が特に有用である。

【0047】患者の症状に応じて、予防的および/または治療的処理のために本発明の医薬組成物を投与することができる。治療に用いるには、組成物を既に疾患に罹患している患者にその疾患およびその合併症を治療するかまたは少なくともいくらか改善するのに十分な量にて投与する。予防に用いるには、本発明の化合物を含有する組成物またはそのカクテルをまだ発病していない患者に投与し、その患者の耐性を強化させる。医薬組成物の一回投与または複数回投与は、顧問医により選択される投与レベルおよびパターンで実施することができる。いずれにしても、本発明の医薬組成物は、患者を効果的に治療するのに十分な一定量の本発明の化合物を供給しなければならない。

#### 【0048】プローブ

本発明の核酸は、ヒトCSBP $\beta$ 配列との特異的ハイブリッド形成能を有するプローブを提供するのに特に有用である。プローブ法は当該分野にて周知であり、プローブの大きさは大きく変化するが、それは大きさが少なくとも15個のヌクレオチドであることが好ましいことは明らかである。また、プローブの同定を容易にするために、かかるプローブは分析的に検出可能な試薬で標識化でき、かつそれが好ましいことは明らかである。有用な試薬は、限定するものではないが、放射性活性体、蛍光染料、検出可能な生成物の形成の触媒能を有する酵素を包含する。本発明は、例えば、異常な、すなわち増加または減少レベルのレセプター遺伝子発現により特徴付けられる病態を診断するにおいてレセプターをコードするプローブを用いることに関する。また、該プローブを用い、そのレセプターをコードする遺伝子にて染色体または分子変異を有する個体を同定することができる。当業者が使用する条件に応じて、そのプローブを用い、他の細胞型および個体よりこの付加的な例示としてのレセプター（そのゲノム形またはcDNA形）を同定かつ回収

することができる。概して、ハイブリッド形成条件を厳格にすればするほど、より密接に関連する遺伝子が回収されるであろう。

#### 【0049】アンチセンス

CSBP $\beta$ について本明細書に開示されている配列に基づくアンチセンスオリゴヌクレオチドも本発明の範囲内にある。レセプター遺伝子をコードする標的核酸を認識して特異的に結合し、遺伝子発現、例えば、標的核酸がmRNAである場合、遺伝子の翻訳を阻害するように、合成オリゴヌクレオチドまたは関連するアンチセンス化学構造アナログを設計する。アンチセンス薬物の作用機構について特定の理論で拘束するつもりはないが、かかる薬物は1またはそれ以上の以下の機構：mRNAに結合し、RNase Iなどの内因性ヌクレアーゼによる分解を誘発することによるか、または産生的タンパク質合成に不可欠な調節因子もしくはリボソーム成分への結合を阻害することによりmRNAの翻訳を阻害することにより作用していると考えられる。加えて、アンチセンス配列は、そのアンチセンス配列がリボザイム配列または反応基と一緒にあり、目的とするmRNAを特異的に標的とするように用いられ、そのmRNAを分解するかまたは化学的に修飾する、機能的巨大分子アレイの成分として用いることができる。アンチセンス技法の一般的分野は、以下の文獻にて示されている。その内容を出典明示により本明細書の一部とする（Cohen, J. S., Trends in Pharm. Sci., 10: 435 (1989) およびWeintraub, H. M., Scientific American Jan. (1990), 40頁）。

#### 【0050】遺伝子治療

本発明はまた、遺伝子治療における本明細書に開示のDNA配列の使用に関する。CSBP $\beta$ はタンパク質キナーゼであるため、キナーゼとして不活性であるが、同じ細胞にて共同発現される内因性CSBP $\beta$ の活性化を遮断する部位特異的変異体を製造することが可能である。すなわち、それは優性陰性変異体である（Kolchら, Nature 349: 426-428 (1991)）。この変異体タンパク質をコードするDNAを遺伝子治療にて用い、慢性炎症を減少させることができた。DNAをインビトロにて標的細胞、例えばアデノウイルス、レトロウイルスに方向づけるのに利用することのできる多くのベクターおよびデリバリー系がある。

#### 【0051】抗体

本発明はまた、CSBP $\beta$ から本明細書に開示されているアミノ酸配列に対応するエピトープに方向付けられるモノクローナルまたはポリクローナル抗体を包含する。免疫学的に、レセプターの特に重要な領域は、タンパク質のリガンド結合ドメインに結合する領域である。該領域に方向付けられる抗体は、タンパク質-リガンド相互反応に対するその効果のため、診断および治療に用いるのに特に有用である。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を産生する方法は周知である。例えば、Ausube

1らのChap. 11 (前掲)を参照のこと。本発明はまた、CSBP $\beta$ 活性化に伴う病態を治療または改善するために、天然のリガンドが該タンパク質に結合することを遮断する、CSBP $\beta$ に拮抗するように方向付けられた有効量の抗体またはそのフラグメントからなる組成物を提供

【0052】本発明の結合タンパク質または少なくとも1つのエピトープを有してなるそのフラグメントを用いて、ポリクローナルおよびモノクローナルの両方の抗体を産生することができる。ポリクローナル抗体が望まし

い場合、選択した哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど)を本発明の結合タンパク質またはそのフラグメントあるいは変異した結合タンパク質で免疫処理する。免疫化動物からの血清を公知方法に従って収集して処理する。ポリクローナル抗体を含有する血清を用いると、ポリクローナル抗体をイムノアフィニティークロマトグラフィーまたは他の公知操作により精製することができる。

【0053】本発明のタンパク質およびそのフラグメントに対するモノクローナル抗体もまた、当業者であれば容易に産生することができる。ハイブリドーマ技法を用いることでモノクローナル抗体を産生する方法論がよく知られている。不死抗体産生細胞系は、細胞融合により、およびまたBリンパ球を腫瘍DNAで直接形質転換するか、またはEpstein-Barrウイルスでトランスフェクションするような他の方法により形成させることができる。例えば、M. Schreierら、[Hybridoma Technique] (1980); Hammerlingら、[Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas] (1981); Kennettら、[Monoclonal Antibodies] (1980)を参照のこと; また、米国特許第4341761号; 第4399121号; 第4427783号; 第444837号; 第4452570号; 第4466917号; 第4472500号; 第4491632号; および第4493890号を参照のこと。目的とするタンパク質またはそのフラグメントに拮抗して産生されるモノクローナル抗体のパネルは、種々の特性について、すなわち、イソタイプ、エピトープ、アフィニティーなどについてスクリーニングすることができる。別法として、目的とするモノクローナル抗体をコードする遺伝子は当該分野にて知られているPCR技法によりハイブリドーマから単離し、適当なベクターにてクローンし、発現させることができる。モノクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーを用い、その抗体が対抗するように方向付けられる個々のタンパク質の精製において有用である。本発明の抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれでも、イムノアッセイ、RIA、ELISAなどで試薬として用いることができるという点で付加的な有用性を有する。加えて、該抗体を用いてヒト細胞からCSBP $\beta$ を単離し、内因性CSBP $\beta$ のリン酸化状態およびタンパク質キナーゼ活性に対する異なる刺激および化合物の効果測定を測定することができ

該抗体を用いて、CSBP $\beta$ のリン酸化またはキナーゼ活性を遮断する新規な化合物を発見または修飾するための組織培養を基礎とするアッセイを確立することができる。かかるアッセイの一例は、CSBP $\beta$ を発現するヒト細胞系を化合物または化合物の混合物と一緒にインキュベートし、所定の期間適当なLPS刺激(例えば、LPS、浸透性ストレス)で処理し、つづいてCSBP $\beta$ を抗体と免疫沈降に付し、イムノブロットまたはクロマトグラフィーまたは適当なタンパク質もしくはペプチド基質でのそのキナーゼ活性の測定を介してそのリン酸化状態を評価することである。

#### 【0054】トランスジェニック

適当な受精卵または宿主の胎児を本明細書に開示のCSBP $\beta$ をコードする核酸でトランスフェクションすることにより、ヒト以外のトランスジェニック動物を得てもよい。例えば、米国特許第4736866号; 第5175385号; 第5175384号および第5175386号を参照のこと。得られたトランスジェニック動物をCSBP $\beta$ /リガンド相互反応を研究するためのモデルとして用いることができる。特に有用な動物は、タンパク質の発現に伴い検出可能な表現型を示す動物である。ついでその関連する表現型を産生または悪化させる薬物の能力について、薬物をスクリーニングすることができる。本発明はまた、CSBP $\beta$ をコードする遺伝子を、種々の温度または代謝条件に特異的に応答する調節因子に機能的に連結させ、それによりその条件に反応して表現形発現を効果的にターンオンまたはオフさせることを意図とする。

【0055】本明細書に開示の核酸プローブを用い、所望の実験動物種からヒトCSBP $\beta$ 遺伝子の同族体バージョン、例えばネズミバージョンをクローンすることができる。その遺伝子が保存的遺伝子ノックアウト技法により排除されているマウス株を発育させることができる。ついで、該遺伝子を本発明のCSBP $\beta$  DNAと置換/交換し、インビボにて候補薬物をスクリーニングするためのマウスを獲得する。同様の遺伝子ノックアウトおよびヒトタンパク質阻害の研究を酵母で行うこともできる。

#### 【0056】

【実施例】本発明を実施例を用いてさらに詳しく説明する。実施例は、特定の具体例を参照することにより本発明を説明するためにのみ提供される。これらの例示説明は本発明の特定の態様を説明するものであるが、開示した発明の範囲を限定または制限するものではない。本明細書中の特定の用語は、上記の定義において説明されている。すべての実施例は標準的方法を用いて行われ、特記しないかぎり、それらの方法は当業者によく知られており、通常のものである。以下の実施例の通常的方法は、例えばSambrookらの標準的な実験室マニュアルに記載されているようにして行うことができる。

#### 【0057】実施例1—組織分布

ノーザンブロットをClontechからのヒトマルチ組織ノーザン上で前記した部分CSBP cDNAを用いて行った (Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumer, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemers, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L. および Young, P. R. (1994) *Nature* 372, 739-746)。

CSBP  $\beta$  はヒト結腸で最も多く発現し、脾臓、前立腺および小腸ではより少なく量で発現した。弱い発現が脾臓、胸腺、PBL および骨格筋で見られた。

【0058】実施例2—MAPキナーゼ種に対するホモロジーおよび発現

CSBP  $\beta$  はセリントレオニン・タンパク質キナーゼのMAPキナーゼ種のメンバーである (Marshall, C. J. (1994) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 4, 32-89)。

MAPキナーゼ種のメンバーは、活性部位付近の活性化ループにて「T x Y」アミノ酸モチーフ (T=トレオニン、Y=チロシンおよびx=いずれかのアミノ酸) を有することで特徴付けられる。適当な刺激に

20 応答してMAPキナーゼキナーゼによりチロシンおよびトレオニンの両方がリン酸化されるには、MAPキナーゼ活性の活性化が必要とされる。「x」アミノ酸の特性および

活性化ループの大きさにより区別される3種のMAPキナーゼがある (Cano, E. および Mahadevan, L. C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122)。

かくして、erk はTSYを有し、JNK/SAPKはTPYを有し、CSBP/p38はTGYを有する。これらの違いは、活性化MAPキナーゼキナーゼ、および各MAPキ

ナーゼを活性化する細胞刺激における違いに反映してい

30 る。各種内で、活性化刺激は非常に似ているようである。したがって、erkは主にミトゲン性刺激 (例えば、EGF、PDGF) に応答するのに対して、JNK/SAPKおよびCSBP/p38は数種の細胞性スト

レス (例えば、UV、浸透性、熱または化学ストレス、低酸素症、酸化剤など) およびプロ炎症性刺激 (例えば、LPS、IL-1、TNFなど) に応答する。

【0059】最近になって、新規な形態のCSBPが数種同定された。CSBPの2種のスプライス変種、CS

BP1およびCSBP2に加えて、核タンパク質Max

40 を用いる酵母2-ハイブリッド相互反応スクリーンを介して、さらなるスプライス化変種が同定された (Zervou, A. S., Puccio, L., Gatto, J. P., Kyriakis, J. M. および Brant, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10531-10534)。

最近になってまた、CSBP種の特徴である「TGY」モチーフも保持している、有意なアミノ酸同一性を有する2つの相同体が同定された：p38 $\beta$  (Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Guener, J. A., Lin, S. および Han, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 17920-17926) およびERK6/SAPK3 (Lochner,

C., Zahalka, M. A., Giot, J.-F., Moller, N. P. H. および Ulrich, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4355-4359; Mertens, E., Craxton, M. および Goedert, M. (1996) *FEBS Lett.* (In Press) )。

【0060】CSBP1およびCSBP2について前記したのと同じ方法にて、CSBP  $\beta$  を酵母発現について遺伝子操作してもよい (Kumar, S., McLaughlin, M. M., McDonnell, P. C., Lee, J. C., Livi, G. P. および Young, P. R. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 29043-29046)。

XhoI部位をポリメラーゼ連鎖反応によりCSBP  $\beta$  の初期コドンで遺伝子操作する (Mullis および Faloona, *Met. h. Enzymol.* 158:335-50 (1987))。

ついで、CSBP  $\beta$  含有のXhoI/BglIIフラグメントをp138NBの同じ部位にライゲートし、Trp選択可能なマーカーをURA3で置換する、p138NB (Moffatt, M. L. Pharm. 39:109-113 (1991)) の修飾を行

った。また、XhoI部位、FLAGエピトープおよびCSBP  $\beta$  のアミノ末端スクレオチド配列を含むポリメラーゼ連鎖反

40 応を用いることで、CSBP  $\beta$  のアミノ末端をFLAGエピトープなどのエピトープ・タグに融合させることができる (例えば、試薬はIBI-Kodakより入手)。

【0061】CSBP  $\beta$  のアミノ末端をFLAGエピトープと融合させることにより、CSBP  $\beta$  をまた、HeLa および JURKAT などの哺乳動物細胞における発現用に遺伝子操作させることができる。ヒトCSBP  $\beta$  の完全な読み枠を含有するXbaI/XhoI制限フラグメントを、そのフラグメントが当初はクローンされて

いるBluescriptプラスミドより除去し、XbaIおよびSmaIで切断したベクターpSPORT (GIBCO-BRL) に挿入した。ついで、得られたベクターpSPORT-CSBP  $\beta$  をSacIおよびBamHIで切

断し、次の2つのオリゴヌクレオチド：5' GATCCGGTACCATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAAAGCCTCATCCGGA

5' GGGCTTCTACAAGCAGGAGCT-3' (配列番号3) および5' -CCTGCTTGTAGAAGCCCTTTTTCGGGATGAGGCTTTTATCATCATCATCTTTATAATCCATG

GTACCG-3' (配列番号4) を一緒にハイブリッド形成することで調製した合成オリゴヌクレオチドリン

カーにライゲートし、pSPORT-FLAG CSBP  $\beta$  を形成させた。ついで、FLAG-CSBP  $\beta$  融合体全体をHindIII/SmaI制限フラグメントのpSPORT-FLAG CSBP  $\beta$  より除去し、HindIIIおよびEcoRVで切断したpCDNにライゲートし、pCDN-FLAG CSBP  $\beta$  を形成させ

た。ついで、これは、多くの確立されたプロトコル、例えば、リポフェクタミン (GIBCO-BRL) を用

50 い、HeLaまたはJURKATなどの哺乳動物細胞に

トランスフェクションすることができる。細胞を適当な刺激（例えば、浸透性ショック、UV、IL-1）で処理し、FLAG-CSBPβの活性化を誘導し、CSAIDのCSBPβのキナーゼ活性を阻害する能力を介してCSAID結合を検出することができる。かくして、FLAG-CSBPβをトランスフェクションされた哺乳動物細胞からFLAGエピトープ（IBI-Kodak）に対する抗体との免疫沈降に付すことができ、前記したようにインビトロ・キナーゼ・アッセイをCSAIDの存在または不在下で適当な基質（例えば、ミエリン塩基性タンパク質、MAPKAPキナーゼ-2または-3）を用いて行うことができる（Leeら、(1994) Nature 372: 739-746; Molaujiら、J. Biol. Chem. 271: 9488-9492 (1996)）。

### 【0062】実施例3-E.coliにおける発現

本発明の単離cDNAによりコードされるタンパク質がCSAIDに結合しうることを確認するために、cDNAをE.coli、酵母および哺乳動物細胞（例えば、HeLa、CHO、BT3）にて発現させることができる。E.coliにおいて、CSBPは、例えばβ-ガラクトシダーゼ、エンテロキナーゼ切断可能なFLAGエピトープタグ、グルタチオンS-トランスフェラーゼまたはヘキサヒスチジン尾部との融合タンパク質として同定される。（FLAGはその試薬がIBI-Kodakより入手可能な市販のエピトープである。）後者の場合、これは開始部位、抗原認識配列およびエンテロキナーゼ切断部位を有する合成オリゴヌクレオチドリンカーを設計することにより達成される。タンパク質をpLac（例えば、Blue-script KSベクター（Stratagene, LaJolla, CA）またはλpL（Shatzmanら、N.Y.Acad.Sci.、478: 233-248 (1986)）プロモーターのいずれかの制御の下で発現させ、細胞ライゼートにて予期される大きさのタンパク質と特異的に連結することが知られているラジオフォアフィニティーCSAIDでプローブに付す。E.coliにて発現したタンパク質は、製造者の指示に従って、FLAGエピトープに対するモノクローナル抗体を含有するアフィニティーマトリックス、グルタチオン・ビーズまたはNINTAカラムに通すことで精製される。

### 【0063】

#### 【配列表】(1) 一般的情報:

(i) 出願人: マックドンネル、ピーター

ヤング、ピーター

(ii) 発明の名称: 薬剤結合蛋白

\*

(x i) 配列の記載: 配列番号1:

```
GCACGAGCG AGCGGCCAG CCGGGGCGG CGAGATCGG TGCCCGGGAT GAGCCTCATE 60
CGGAAAAAGG GCTTCTACAA GCAGGAGCTC AACAGACCG CCTGGGAGCT GCCAAGACC 120
TAGTCTCCG CGACGCACGT CGGAGCGGG GCCTATGGCT CCTGGTCTC GCCATCGAC 180
AAGCGTTCAG GGGAGAGGT GGCCATCAAG AAGCTGAGCC GAGCTTTCA GTCCGAGATT 240
TTCCCTAAGC GCGCTTACG CGAGCTCTG CTGCTGAGC ACATGCAGCA TGAGAACGTC 300
ATTGGGCTCC TGATGTTTIT CAGCCGAGCC TCCTCTCTG GCAACTTCTA TGACTTCTAC 360
```

\* (i i i) 配列の数: 4

(i v) 連絡先:

(A) 宛名: スミスクライン・ピーチャム・コーポレーション

(B) 通り名: スウェード・ランド709番

(C) 都市名: キング・オブ・ブルシア

(D) 州名: ペンシルベニア州

(E) 国名: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 19406-0939

(v) コンピューター・リーダブル・フォーム:

(A) 媒体形態: ディスケット

(B) コンピューター: IBM コンパチブル

(C) オペレーティングシステム: DOS

(D) ソフトウェア: FastSEQ Version 1, 5

(v i) 現出願データ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(v i i) 先の出願データ

(A) 出願番号: 08/468902

(B) 出願日: 1995年6月6日

(A) 出願番号: 08/123175

(B) 出願日: 1993年9月17日

(A) 出願番号: 08/250975

(B) 出願日: 1994年5月31日

(v i i i) 代理人等の情報:

(A) 氏名: シュレック、パトリシア・エイ

(B) 登録番号: 33,777

(C) 代理人等における処理番号: ATG50036

(i x) テレコミュニケーションの情報:

(A) 電話番号: 610 270 5031

(B) テレファックス番号: 610 270 5090

【0064】(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 1838塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本

(D) トポロジー: 直鎖状

(i i) 分子の型: cDNA

(i i i) ヒポセディカル: なし

(i v) アンチセンス: なし

(v) 起源:

29

30

CTGGTGATGC CCTTCATGCA GACGGATCTG CAGAAATCA TGGGATGHA GTTCAGTCAG 429  
 GAGAAATGCC AGTACCTGGT STATCAGATG CTCAAAGGCC TTAAGTACAT CCACTCTGCT 489  
 GGGTCTGTC ACAGGGAGCT GAGGCCAGGC AACCTGGCTG TGAATGAGHA CTGTGAACTG 549  
 AAGATTCTGG ATTITGGHET GGGCCGACAT GCAGACCCG AGATGACTGG CTACGTGGTG 609  
 ACCCGCTGGT ACCGAGCCCG CGAGGTGATC CTCAGCTGGA TGCCTACAA CCAGACAGTG 669  
 GACATCTGGT CTGTGGCTG TATCATGGCA GAGATGCTGA CAGGGAAAAC TCTGTTCAAG 729  
 GGGAAAGATT ACCTGGACCA GCTGACCCAG ATCTGAAAG TGACCGGGT GCGTGGCAG 789  
 GAGTTTGTGC AGAAGCTGAA CGACAAAGCG CCCTAAATCT ACATCCAGTC CCGTCCACAG 849  
 ACCCCAGGA AGGATTTCAC TCAGCTGTTC CCAGGGGCCA GCGCCAGGC TGGGAGCTG 909  
 CTGGAGAAGA TGCTGGAGCT AGAGCTGGAC AAGCGGCTGA CGGCGCGCA GGGCCTCACC 969  
 CATCCCTTCT TTGAACCTTT CCGGACCCCT GAGGAAGAGA CCGAGGCCCA CGAGCCGTTT 1029  
 GATGATTCCT TAGAACAGCA GAAACTCACA GTGGATGAAT GGAAGCAGCA CATCTACAAG 1089  
 GAGATTGTGA ACTTCAGCCC CATTGCCCGG AAGGACTCAC GCGCCCGAG TGGCATGAAG 1149  
 CTGTAGGAGC TCATTTTGA TGGCAGCCGC GCGCAGACAC TGCCCAAGGA CCAGTATTTG 1209  
 TCACTACCAA ACTCAGCCCT TCTTGGAAAT CAGCTTTTCA AGCAGAGGAC AGAAGGGTCC 1269  
 TTCTCCITAT GTGGGAAATG GCGCTAGTAG ATGCAGAATT CAAGCATGTC GGTGGGAGA 1329  
 AACTAGCTCT GATCTAACA GGCACCTTA AACTGCCCAT CTGGAGAATC GCGTGCAGGT 1389  
 GGGGCGCTTT CCTTCCCGCC AGAGTGGGGC TGAAGGGCG CTGAGCCAGG CCGGGGCGCT 1449  
 ATGGCAGTGA TGCTGTGTTG GTTCTCTAGG GATGCTCTAA CGAATTACCA CAAACCTGGT 1509  
 GGATTGAAAC AGCAGAACTT GATTCCCTTA CAGTTCTGGA GAGTGGAAAT YTGGAATGGA 1569  
 GGTGTGGCA GGGCTGTGGT CCCTTTGAAG GCTCTGGGA AGAATCTTTC CTGGCTCTT 1629  
 TTTAAGTTGT GGGGCACTG GGCAGTCCCT GGCATTCCCC AGCTTATTGC TGATCACTC 1689  
 CAGTCTCTGT CTCTCTCTT CTCTCTCTT TTAACAACAG TCATTGGATT TAGGGCCAC 1749  
 CCTAATCTG TGTGATTTA TTTGATCTT TATTAATTA ACCTGCAAT ACTCTAGTTC 1809  
 CAAATAAAGT CACATTCTCA GGTCCAGGT GGACATGA 1869

【0065】(2) 配列番号2の情報:

\* (i i) 分子の型: ペプチド

(i) 配列の特徴:

(i i i) ヒポセディカル: なし

(A) 配列の長さ: 365 アミノ酸

(i v) アンチセンス: なし

(B) 配列の型: アミノ酸

(v) フラグメントの型: N-末端

(C) 鎖の数: 一本

30

(v i) 起源:

(D) トポロジー: 直鎖状

\*

(x i) 配列の記載: 配列番号2:

Met Ser Leu Ile Arg Lys Lys Gly Phe Tyr Lys Glu Glu Leu Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Trp Glu Leu Pro Lys Thr Tyr Val Ser Pro Thr His Val Gly  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Tyr Gly Ser Trp Cys Ser Ala Ile Asp Lys Arg Ser Gly  
 35 40 45  
 Glu Lys Val Ala Ile Lys Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Glu Ile  
 50 55 60  
 Phe Ala Lys Arg Ala Tyr Arg Glu Leu Leu Leu Lys His Met Gln  
 65 70 75 80  
 His Glu Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Ser Ser  
 85 90 95  
 Leu Arg Asn Phe Tyr Asp Phe Tyr Leu Val Met Pro Phe Met Gln Thr  
 100 105 110  
 Asp Leu Gln Lys Ile Met Gly Met Glu Phe Ser Glu Glu Lys Ile Gln  
 115 120 125  
 Tyr Leu Val Tyr Gln Met Leu Lys Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala  
 130 135 140

31 32

Gly Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Gly Asn Leu Ala Val Asn Glu  
145 150 155 160

Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Ala Asp  
165 170 175

Ala Glu Met Thr Gly Tyr Val Val Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu  
180 185 190

Val Ile Leu Ser Trp Met His Tyr Asn Glu Thr Val Asp Ile Trp Ser  
195 200 205

Val Gly Cys Ile Met Ala Glu Met Leu Thr Gly Lys Thr Leu Phe Lys  
210 215 220

Gly Lys Asp Tyr Leu Asp Gln Leu Thr Gln Ile Leu Lys Val Thr Gly  
225 230 235 240

Val Pro Gly Thr Gln Phe Val Gln Lys Leu Asn Asp Lys Ala Ala Lys  
245 250 255

Ser Tyr Ile Glu Ser Leu Pro Gln Thr Pro Arg Lys Asp Phe Thr Glu  
260 265 270

Leu Phe Pro Arg Ala Ser Pro Gln Ala Ala Asp Leu Leu Glu Lys Met  
275 280 285

Leu Glu Leu Asp Val Asp Lys Arg Leu Thr Ala Ala Glu Ala Leu Thr  
290 295 300

His Pro Phe Phe Glu Pro Phe Arg Asp Pro Glu Glu Glu Thr Glu Ala  
305 310 315 320

Gln Gln Pro Phe Asp Asp Ser Leu Glu His Glu Lys Leu Thr Val Asp  
325 330 335

Glu Trp Lys Gln His Ile Tyr Lys Glu Ile Val Asn Phe Ser Pro Ile  
340 345 350

Ala Arg Lys Asp Ser Arg Arg Arg Ser Gly Met Lys Leu  
355 360 365

- 【0066】(2) 配列番号3の情報: \* (i i) 分子の型: cDNA  
(i) 配列の特徴: 30 (i i i) ヒポセティカル: なし  
(A) 配列の長さ: 76塩基対 (i v) アンチセンス: なし  
(B) 配列の型: 核酸 (v) フラグメントの型:  
(C) 鎖の数: 一本 (v i) 起源:  
(D) トポロジー: 直鎖状 \*

(x i) 配列の記載: 配列番号3:

GATCGGTAC CATGGATTAT AAGATGATG ATGATAAAG CCTCATCGG AAAAAGGCT 60  
TCTACAAGCA GGAGCT 76

- 【0067】(2) 配列番号4の情報: \* (i i) 分子の型: cDNA  
(i) 配列の特徴: (i i i) ヒポセティカル: なし  
(A) 配列の長さ: 68塩基対 40 (i v) アンチセンス: なし  
(B) 配列の型: 核酸 (v) フラグメントの型:  
(C) 鎖の数: 一本 (v i) 起源:  
(D) トポロジー: 直鎖状 \*

(x i) 配列の記載: 配列番号4:

CCTGCTTGTA GAAGCCCTTT TTCCGGATGA GGCTTTTATC ATCATCATCT TTATAATCCA 60  
TGGTACCG 68

【図面の簡単な説明】

【図1】 CSBPβの核酸配列およびアミノ配列を示す。

【図2】 CSBPβの核酸配列およびアミノ配列を示す。 50

す。

【図3】 CSBPβの核酸配列およびアミノ配列を示す。

GCAAGACGCGCAGCCGCACGCCGGCCGCGCCAGATCCGGTCCCCGGCATGACCTTCATC	60
M S L I	
CGGAAAAAGGGCTTTCTACAGCAGGAGGCTCAACAGAGCCGCTCGGAGCTGCCCCAGACC	120
R K K G F Y K Q E L N K T A W E L P K T	
TACGTCTCCCGACCCACGCTCGSCAGCGSGGCTTATGCTCTCTGCTGCTKGGCCATCGAC	180
Y V S P T H V G S G A Y C S W C S A I D	
AACCGCTCACGGGAGAGGCTGGCCATCAGAGAGCTGAGCCGACCCCTTCAGTCCGAGATT	240
K R S G E K V A I X K L S R P F Q S E T	
TTGCCCAAGCGCGCCTACCGGGAGCTCTCTCTCTGCTGAASCACATGCGCATGAGAAGCTC	300
F A K R A Y R E L L L L L K H N Q H E N V	
ATGGGGCTCTCTGGATGTTTTACACCCAGCCCTCTCTCTCTCGCCAACTTCTATGACTTCTAC	360
I G L L D V F T P A S S L R N F Y D F Y	
CTGCTGATRCCTTATGTCAGACCGGATCTGCSAAGATCATGGGATGGASTTCAGTGAG	420
L V M P F N O T D L Q K I M G N E F S E	
GACAAGATCCAGTAACCTGCTGTATCAGATGCTCAAGGCTTAASTACATCCACTCTGCT	480
E X I Q Y L V Y Q M L K G L K Y I K S A	
GGGGTCTGTGCACAGGGACCTGAAGCCAGGCAACCTGGCTGTGAATGAGGACTGTGAACTG	540
G V V H R D L K P G N L A V N E D C E L	
AAGATTTCTGGATTTTGGGCTGGCGGACATGCAGACGCCGAGATGACTGGCTACCTGGTG	600
K I L D F G L A R H A D A E M T G Y V V	
ACCCGCTGGTACCGAGGCCCGAGGTGATCTCAGCTGGATGCACCTACACACCAGACAGTG	660
T R W Y R A P E V I L S W M H Y N O T V	

【図2】

## 図1の続き

GACATCTGGTCTGTGGGCTGTATCATGCGCAGAGATGCTGACAGGGAAAACCTCTTTTCAAG 720  
 D I W S V G C I M A E N L T G K T L F K

GCGAAGATTACCTTGACACAGCTGACCCAGATCCTGAAAGTGACCGGGTGGCTTGGCAAG 780  
 G X D Y L D Q L T Q I L K V T G V F G T

GAGTTTGTGCAGAAAGCTGAACGACAAAGGGGCTAATCCTACATCCAGTCCCTGCCACAG 840  
 E F V Q K L N D E A A K S Y I Q S L P Q

ACCCTTCAGGAAGGATTTCACTCAGCTGTTCCTCAGCGGCCAGCGCCCGAGGCTGCGGACCTG 900  
 T P R K D F T Q L F P R A S P Q A A D L

CTGGAGAACATGCTGCAGCTTGACGTGGACAAAGCGCTTACGCGCGCGCAGGCGCTCACC 960  
 L E X M L E L D V D K R L T A A Q A L T

CATCCCTTCTTTGAACCTTTCGGGACCTTGAGGAGAGACGGAGGCGCCAGCAGCGCTTT 1020  
 H P F F E P F R D P E E E T E A Q Q P F

GATGATTCCTTAGAACACGAGAACTCACAGTGGATGAATGGAAGCAGCACATCTACAG 1080  
 D D S L E H E K L T V D E W K Q H T Y K

GAGATTGTGAAGTTTCAGCGCCATGCGCCGGAAGGACTCACGCGCGCGGAGTGGCATGAG 1140  
 E I V N F S P I A R K D S R R R S C H K

CTGTAGGAGACTCATCTTGCATGGCACCGCGCGCCAGCACTGCGCCAGGACCAAGTATTTG 1200  
 L \*

TCACTACCAAACTCGGCGCTTCTTGGAAATACAGGCTTTCAAGCAGAGAACAGAGGGTTC 1260

TTCTCCTTATGTGGAAATGGGCTTAGTAGATGCAGAATTCAAAGATGTCGCTTGGGAGA 1320

AACAGCTCTGATCTAACAGGCGACGTTAAACTGCCCATCTGGAGAATGCGCTGAGGT 1380

GGGGCGCTTCTTCCCGCCAGAGTGGGCGCTGAGTGGGCGCTGAGCCAGGCGGGGCGCT 1440

ATGGCAGTATGCTGTGTGTGTTCTTAGGCGATGCTCTAAGGANTTACACAAACCTGCT 1500

## 【図3】

## 図2の続き

```

GGATTGAAACAGCAGAACTTGATTCCCTTACAGTTCTGGAGGCTGGAAATTTGGGATGGA 1550
GGTGTTGOCAGGGCTGTGGTCCCTTTGAGGECTCTGGGGZAGAATCCTTCCTTGGCTCTT 1620
TTTASCTTGTGGCCGGCAGTGGGCASTCCCTGGCATTCCCCAGCTTATTGCTGCATCACTC 1690
CAGTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1740
OCTAATCCTGTGTGATTTATTTTGATCCTTATTAATTAACCTGCAATACTCTAGTTC 1800
CAATAAASTCAZATTCTCAGSTTCCASGTGGACATCA 1838

```

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	
A 6 1 K	48/00	C 0 7 K	14/47
C 0 7 K	14/47		16/18
	16/18	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P	21/02
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 Q	1/02		1/48
	1/48		1/68
	1/68	C 1 2 P	21/08
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/02
(C 1 2 P	21/02		
C 1 2 R	1/19)		

(72) 発明者 ビーター・ロナルド・ヤング  
 アメリカ合衆国08648ニュージャージー州  
 ローレンスビル、ヘンドリクソン・ロード  
 32番

【外国語明細書】

DRUG BINDING PROTEINCross-Reference to Related Applications:

This application is a continuation-in-part application of pending U.S. application Serial No.08/468,902, filed June 6, 1995 which is a continuation-in-part application of U.S. Application Serial No. 08/250,975 filed May 31, 1994 which is a continuation-in-part application of pending U.S. Application Serial Number 08/123,175, filed September 17, 1993, the contents of which are incorporated herein by reference.

Field of the Invention:

This invention relates, *inter alia*, to drug binding proteins, to genes encoding same and to assays and methods for screening pharmaceuticals. More specifically, this invention relates to the Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug (CSAID) binding proteins CSBP $\beta$ , to genes encoding same and to assays and screens useful in the evaluation and characterization of drugs of this pharmacologic class.

Background of the Invention:

Cytokines play an important role in regulating the cellular response during inflammation and other immune functions. Of particular interest are the cytokines interleukin-1 (IL-1,  $\alpha$  and  $\beta$ ) and tumor necrosis factor (TNF,  $\alpha$  and  $\beta$ ), which are the intercellular proteins involved in the initial step of the inflammatory response cascade (Arai, et al., *Ann. Rev. Biochem.* 59: 783-836 (1990)). Thus, there has been a substantial amount of research recently devoted to interfering with the production of IL-1 and TNF in response to an inflammatory stimulus.

One therapeutic approach involves suppressing the production of IL-1 and TNF at the level of transcription and/or translation and/or secretion. The activities associated with certain of pyridinyl imidazoles led to a class of compounds referred to as "CSAIDs", or Cytokine Suppressing Anti-Inflammatory Drugs. These compounds appear to arrest the expression of IL-1 and TNF predominantly at the translational level, although a lesser effect on transcription has also been observed but effects on other steps cannot be ruled out.

The pyridinyl imidazole, 5-(4-pyridyl)-6(4-fluorophenyl)-2,3-dihydroimidazo(2,1-b)thiazole (SK&F 86002) was identified as the prototypic CSAID. The basis for its activity has been established and characterized (Lee, et al., *Int'l. J. Immunopharm.* 10(7): 835-843 (1988); *Agents and Actions* 27(3/4): 277-279 (1989) and *Int'l. J. Immunother.* 6(1):1-12 (1990)). SAR studies suggest that cytokine suppressive effect of the pyridinyl imidazoles

整理番号 159287

represents a unique activity independent of their inhibitory effects on eicosanoid and leukotriene production.

Since the CSAIDs have substantial potential as novel anti-inflammatory therapeutic agents, there is significant interest in characterizing their mechanism of action at the molecular level, as well as obtaining compounds with increased selectivity and potency. Specifically, identification and characterization of the CSAID molecular target would enhance the understanding of the biochemical processes involved in inflammation and aid in the design and screening of more potent anti-inflammatory drugs. This invention discloses, *inter alia*, the purification and characterization of additional CSAID binding proteins (CSBPs).

#### Brief Description of the Invention:

The DNAs of this invention, such as the specific sequences disclosed herein, are useful in that they encode the genetic information required for the expression of the novel CSBPs. Additionally, the sequences may be used as probes in order to isolate and identify any additional members of the CSBP family as well as forming the basis of antisense therapy for disease conditions which are characterized by atypical expression of the CSBP gene. The novel protein itself is useful directly as a therapeutic or diagnostic agent as well as a component in a screening system for compounds which are antagonists or agonists of CSAID binding activity. The protein is also useful for eliciting antibody production in heterologous species, said antibodies being useful for the aforesaid diagnostic, therapeutic and screening applications. These and additional uses for the reagents described herein will become apparent to those of ordinary skill in the art upon reading this specification.

#### Brief Description of the Figures

Figure 1 illustrates the nucleic acid sequence and amino sequence of a CSBP.

#### Detailed Description of the Invention:

Using the information provided herein, such as the polynucleotide sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 1) a polynucleotide of the present invention encoding CSBP may be obtained using standard cloning and screening procedures, such as those for cloning cDNAs using mRNA from testis and T cells as starting material. Illustrative of the invention, a partial fragment of the polynucleotide set out in Figure 1 was discovered in a cDNA library derived from cells of

整理番号 159287

human testis using the expressed sequence tag (EST) analysis (Adams, M.D., *et al. Science*, (1991), 252:1651-1656; Adams, M.D. *et al. Nature*, (1992), 355:632-634; Adams, M.D., *et al. Nature*, (1995), 377 Supp:3-174). A longer cDNA corresponding to the sequence in Figure 1 and containing a complete open reading frame for protein translation as indicated was subsequently cloned via hybridization using standard cloning and screening procedures from an activated T cell library.

CSBP of the invention is structurally related to other proteins of the CSBP family. The nucleotide sequence encoding the CSBP of this invention has about 58-73% identity over its entirety with other human members of the MAP Kinase family.

Polynucleotides of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA, or in the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA obtained by cloning or produced by chemical synthetic techniques or by a combination thereof. The DNA may be double-stranded or single-stranded. Single-stranded DNA may be the coding strand, also known as the sense strand, or it may be the non-coding strand, also referred to as the anti-sense strand.

The coding sequence which encodes the polypeptide may be identical to the coding sequence of the polynucleotide shown in Figure 1, (SEQ ID NO: 1). It also may be a polynucleotide with a different sequence, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of Figure 1, (SEQ ID NO: 2).

Polynucleotides of the present invention which encode the polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) may include, but are not limited to, the coding sequence for the mature polypeptide, by itself, the coding sequence for the mature polypeptide and additional coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, such as a pre-, or pro- or prepro- protein sequence; and the coding sequence of the mature polypeptide, with or without the aforementioned additional coding sequences, together with additional, non-coding sequences, including, but not limited to, introns and non-coding 5' and 3' sequences, such as the transcribed, non-translated sequences that play a role in transcription, and mRNA processing, including splicing and polyadenylation signals, for example, for ribosome binding and stability of mRNA. Coding sequences which provide additional functionalities may also be incorporated into the polypeptide. Thus, for instance, the polypeptide may be fused to a marker sequence, such as a peptide, which facilitates purification of the fused polypeptide. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.). As described in Gritz *et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1989, 86:821-824, for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. In other embodiments the

整理番号 159287

marker sequence is a HA tag. The HA tag corresponds to an epitope derived of influenza hemagglutinin protein, which has been described by Wilson *et al.*, *Cell*, 1984, 37:757, for instance. Many other such tags are commercially available.

5 In accordance with the foregoing, the term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, interrupted by introns) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

The present invention further relates to variants of the polynucleotides which encode for fragments, analogs and derivatives of the polypeptide having the deduced amino acid sequence of 10 Figure 1 (SEQ ID NO: 2). A variant of the polynucleotide may be a naturally occurring variant such as a naturally occurring allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Such non-naturally occurring variants of the polynucleotide may be made by mutagenesis techniques, including those applied to polynucleotides, cells or organisms.

15 Among variants in this regard are variants that differ from the aforementioned polynucleotides by nucleotide substitutions, deletions or additions. The substitutions, deletions or additions may involve one or more nucleotides. The variants may be altered in coding or non-coding regions or both. Alterations in the coding regions may produce conservative or non-conservative amino acid substitutions, deletions or additions.

20 Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polynucleotides encoding polypeptides having the amino acid sequence CSBP $\beta$  set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 2); variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and fragments of the variants, analogs and derivatives.

Further particularly preferred are polynucleotides encoding CSBP $\beta$  variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, which have the 25 amino acid sequence of the CSBP $\beta$  polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the CSBP $\beta$ . Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polynucleotides encoding 30 polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), without substitutions.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 75% identical to a polynucleotide encoding the CSBP $\beta$  polypeptide having the amino acid sequence set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 2), and polynucleotides which are complementary to such

整理番号 159287

polynucleotides. Most highly preferred are polynucleotides that comprise a region that is at least 80% identical to a polynucleotide encoding the CSBP $\beta$  polypeptide of the human cDNA of the deposited clone and polynucleotides complementary thereto. In this regard, polynucleotides at least 90% identical to the same are particularly preferred, and those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred and those with at least 98-99% are most highly preferred, with at least 99% being the most preferred.

Particularly preferred embodiments in this respect, moreover, are polynucleotides which encode polypeptides which retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by the cDNA of Figure 1 (SEQ ID NO: 2).

The present invention further relates to polynucleotides that hybridize to the polynucleotide encoding a polypeptide of this invention. In this regard, the present invention especially relates to polynucleotides which hybridize under stringent conditions to the herein above-described polynucleotides. As herein used, the term "stringent conditions" means hybridization will occur only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences.

The polynucleotides of this invention may encode a polypeptide which is the mature protein plus additional amino or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the mature polypeptide (when the mature form has more than one polypeptide chain, for instance). Such sequences may play a role in processing of a protein from precursor to a mature form, may facilitate protein trafficking, may prolong or shorten protein half-life or may facilitate manipulation of a protein for assay or production, among other things. As generally is the case *in situ*, the additional amino acids may be processed away from the mature protein by cellular enzymes.

A precursor protein, having the mature form of the polypeptide fused to one or more prosequences may be an inactive form of the polypeptide. When prosequences are removed such inactive precursor generally are activated. Some or all of the prosequences may be removed before activation. Generally, such precursors are called proproteins.

In sum, a polynucleotide of the present invention may encode a mature protein, a mature protein plus a leader sequence (which may be referred to as a preprotein), a precursor of a mature protein having one or more prosequences which are not the leader sequences of a preprotein, or a preproprotein, which is a precursor to a proprotein, having a leader sequence and one or more prosequences, which generally are removed during processing steps that produce active and mature forms of the polypeptide.

#### Polypeptides

整理番号 159287

The present invention further relates to a CSBP $\beta$  polypeptide which has the deduced amino acid sequence of Figure 1, SEQ ID NO: 2.

The invention also relates to fragments, analogs and derivatives of these polypeptides. The terms "fragment," "derivative" and "analog" when referring to the polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), mean a polypeptide which retains essentially the same biological function or activity as such polypeptide, i.e. functions as a CSBP $\beta$ , or retains the ability to bind the ligand or the binding molecules even though the polypeptide does not otherwise function as a CSBP $\beta$ . Thus, an analog includes, for example, a proprotein which can be activated by cleavage of the proprotein portion to produce an active mature polypeptide.

The polypeptide of the present invention may be a recombinant polypeptide, a natural polypeptide or a synthetic polypeptide. In certain preferred embodiments, it is a recombinant polypeptide.

The fragment, derivative or analog of the polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) may be (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code; (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group; (iii) one in which the mature polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethylene glycol); or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the mature polypeptide, such as a leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the mature polypeptide or a proprotein sequence. Such fragments, derivatives and analogs are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

Among the particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of CSBP $\beta$  set out in Figure 1 (SEQ ID NO: 2), variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments. Further particularly preferred embodiments of the invention in this regard are polypeptides having the amino acid sequence of CSBP $\beta$ , variants, analogs, derivatives and fragments thereof, and variants, analogs and derivatives of the fragments which retain the CSAID binding activity/function of CSBP $\beta$ .

Further particularly preferred in this regard are variants, analogs, derivatives and fragments, and variants, analogs and derivatives of the fragments, having the amino acid sequence of the CSBP $\beta$  polypeptide of Figure 1 (SEQ ID NO: 2), in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1

整理番号 159287

to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, which do not alter the properties and activities of the CSBP $\beta$ . Also especially preferred in this regard are conservative substitutions. Most highly preferred are polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 2) without substitutions.

The polypeptides and polynucleotides of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are purified to homogeneity.

The polypeptides of the present invention include the polypeptide of SEQ ID NO: 2 (in particular the mature polypeptide) as well as polypeptides which have at least 80% identity to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and more preferably at least 90% similarity (more preferably at least 90% identity) to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and still more preferably at least 95% similarity (still more preferably at least 95% identity) to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and also include portions of such polypeptides with such portion of the polypeptide generally containing at least 30 amino acids and more preferably at least 50 amino acids.

polypeptide fragments

Fragments or portions of the polypeptides of the present invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, the fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides. Fragments or portions of the polynucleotides of the present invention may be used to synthesize full-length polynucleotides of the present invention. Fragments may be "free-standing," i.e., not part of or fused to other amino acids or polypeptides, or they may be comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region. When comprised within a larger polypeptide, the presently discussed fragments most preferably form a single continuous region. However, several fragments may be comprised within a single larger polypeptide. For instance, certain preferred embodiments relate to a fragment of a CSBP $\beta$  polypeptide of the present comprised within a precursor polypeptide designed for expression in a host and having heterologous pre and pro-polypeptide regions fused to the amino terminus of the CSBP $\beta$  fragment and an additional region fused to the carboxyl terminus of the fragment. Therefore, fragments in one aspect of the meaning intended herein, refers to the portion or portions of a fusion polypeptide or fusion protein derived CSBP $\beta$ .

As representative examples of polypeptide fragments of the invention, there may be mentioned those which have from about 5-15, 10-20, 15-40, 30-55, 41-75, 41-80, 41-90, 50-100, 75-100, 90-115, 100-125, and 110-113 amino acids in length.

整理番号 159287

In this context "about" includes the particularly recited range and ranges larger or smaller by several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues at either extreme or at both extremes. For instance, about 40-90 amino acids in this context means a polypeptide fragment of 40 plus or minus several, a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues to 90 plus or minus several a few, 5, 4, 3, 2 or 1 amino acid residues, i.e., ranges as broad as 40 minus several amino acids to 90 plus several amino acids to as narrow as 40 plus several amino acids to 90 minus several amino acids. Highly preferred in this regard are the recited ranges plus or minus as many as 5 amino acids at either or at both extremes. Particularly highly preferred are the recited ranges plus or minus as many as 3 amino acids at either or at both the recited extremes. Especially particularly highly preferred are ranges plus or minus 1 amino acid at either or at both extremes or the recited ranges with no additions or deletions. Most highly preferred of all in this regard are fragments from about 5-15, 10-20, 15-40, 30-55, 41-75, 41-80, 41-90, 50-100, 75-100, 90-115, 100-125, and 110-115 amino acids long.

Among especially preferred fragments of the invention are truncation mutants of CSBPβ. Truncation mutants include CSBPβ polypeptides having the amino acid sequence of Figure 1 (SEQ ID NO: 1), or of variants or derivatives thereof, except for deletion of a continuous series of residues (that is, a continuous region, part or portion) that includes the amino terminus, or a continuous series of residues that includes the carboxyl terminus or, as in double truncation mutants, deletion of two continuous series of residues, one including the amino terminus and one including the carboxyl terminus. Particularly preferred fragments of the membrane bound receptors of this invention, include soluble forms of the receptor comprising the extracellular domain without its attendant transmembrane and cytoplasmic domain or transmembrane region deletions resulting a receptor in which the extracellular domain is fused directly to the cytoplasmic domain. See for example, published PCT application number WO94/03620. Fragments having the size ranges set out above also are preferred embodiments of truncation fragments, which are especially preferred among fragments generally.

Also preferred in this aspect of the invention are fragments characterized by structural or functional attributes of CSBPβ. Preferred embodiments of the invention in this regard include fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions ("alpha-regions"), beta-sheet and beta-sheet-forming regions ("beta-regions"), turn and turn-forming regions ("turn-regions"), coil and coil-forming regions ("coil-regions"), hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions and high antigenic index regions of CSBPβ.

整理番号 159287

Among highly preferred fragments in this regard are those that comprise regions of CSBPs that combine several structural features, such as several of the features set out above. In this regard, the regions defined by the residues about 10 to about 20, about 40 to about 50, about 70 to about 90 and about 100 to about 113 of Figure 1, which all are characterized by amino acid compositions highly characteristic of turn-regions, hydrophilic regions, flexible-regions, surface-forming regions, and high antigenic index-regions, are especially highly preferred regions. Such regions may be comprised within a larger polypeptide or may be by themselves a preferred fragment of the present invention, as discussed above. It will be appreciated that the term "about" as used in this paragraph has the meaning set out above regarding fragments in general.

Further preferred regions are those that mediate activities of CSBPs. Most highly preferred in this regard are fragments that have a chemical, biological or other activity of CSBPs, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Highly preferred in this regard are fragments that contain regions that are homologs in sequence, or in position, or in both sequence and in active regions of related polypeptides.

It will be appreciated that the invention also relates to, among others, polynucleotides encoding the aforementioned fragments, polynucleotides that hybridize to polynucleotides encoding the fragments, particularly those that hybridize under stringent conditions, and polynucleotides, such as PCR primers, for amplifying polynucleotides that encode the fragments. In these regards, preferred polynucleotides are those that correspond to the preferred fragments, as discussed above.

vectors, host cells and expression

The proteins of this invention are preferably made by recombinant genetic engineering techniques. The isolated nucleic acids, particularly the DNAs, can be introduced into expression vectors by operatively linking the DNA to the necessary expression control regions (e.g. regulatory regions) required for gene expression. The vectors can be introduced into the appropriate host cells such as prokaryotic (e.g., bacterial), or eukaryotic (e.g., yeast or mammalian) cells by methods well known in the art (Ausubel et al., *supra*). The coding sequences for the desired proteins having been prepared or isolated, can be cloned into any suitable vector or replicon. Numerous cloning vectors are known to those of skill in the art, and the selection of an appropriate cloning vector is a matter of choice. Examples of recombinant DNA vectors for cloning and host cells which they can transform include the bacteriophage  $\lambda$  (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (gram-negative bacteria), pGV1106 (gram-negative bacteria), pLAFR1 (gram-negative bacteria), pME299 (non-*E. coli* gram-negative bacteria), pHV14 (*E. coli* and *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*),

整理番号 159287

pIJ61 (Streptomyces), pUC6 (Streptomyces), YIp5 (Saccharomyces), a baculovirus insect cell system, , YCp19 (Saccharomyces). See, generally, "DNA Cloning": Vols. I & II, Glover et al., eds. IRL Press Oxford (1985) (1987) and; T. Maniatis et al. "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

3       The gene can be placed under the control of a promoter, ribosome binding site (for bacterial expression) and, optionally, an operator (collectively referred to herein as "control" elements), so that the DNA sequence encoding the desired protein is transcribed into RNA in the host cell transformed by a vector containing this expression construction. The coding sequence may or may not contain a signal peptide or leader sequence. The subunit antigens of  
10 the present invention can be expressed using, for example, the *E. coli* lac promoter or the protein A gene (*spa*) promoter and signal sequence. Leader sequences can be removed by the bacterial host in post-translational processing. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

15       In addition to control sequences, it may be desirable to add regulatory sequences which allow for regulation of the expression of the protein sequences relative to the growth of the host cell. Regulatory sequences are known to those of skill in the art, and examples include those which cause the expression of a gene to be turned on or off in response to a chemical or physical stimulus, including the presence of a regulatory compound. Other types of regulatory elements may also be present in the vector, for example, enhancer sequences.

20       An expression vector is constructed so that the particular coding sequence is located in the vector with the appropriate regulatory sequences, the positioning and orientation of the coding sequence with respect to the control sequences being such that the coding sequence is transcribed under the "control" of the control sequences (i.e., RNA polymerase which binds to the DNA molecule at the control sequences transcribes the coding sequence). Modification of  
25 the sequences encoding the particular protein of interest may be desirable to achieve this end. For example, in some cases it may be necessary to modify the sequences so that it may be attached to the control sequences with the appropriate orientation; i.e., to maintain the reading frame. The control sequences and other regulatory sequences may be ligated to the coding sequence prior to insertion into a vector, such as the cloning vectors described above.  
30 Alternatively, the coding sequence can be cloned directly into an expression vector which already contains the control sequences and an appropriate restriction site.

      In some cases, it may be desirable to add sequences which cause the secretion of the polypeptide from the host organism, with subsequent cleavage of the secretory signal.

整理番号 159287

Alternatively, gene fusions may be created whereby the gene encoding the binding protein of interest is fused to a gene encoding a product with other desirable properties. For example, a fusion partner could provide known assayable activity (e.g., enzymatic) which could be used as an alternative means of selecting the binding protein. The fusion partner could be a structural element, such as a cell surface element such that the binding protein (a normally cytosolic component) could be displayed on the cell surface in the form of a fusion protein. Alternatively, it could be peptide or protein fragment which can be detected with specific antibodies and reagents, and may act as an aid to purification (eg His tag, Glutathione S-transferase fusion). It may also be desirable to produce mutants or analogs of the protein of interest. Mutants or analogs may be prepared by the deletion of a portion of the sequence encoding the protein, by insertion of a sequence, and/or by substitution of one or more nucleotides within the sequence. Techniques for modifying nucleotide sequences, such as site-directed mutagenesis and the formation of fusion proteins, are well known to those skilled in the art. See, e.g., T. Maniatis et al., *supra*; DNA Cloning, Vols. I and II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

A number of prokaryotic expression vectors are known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,378,355; 4,440,859; 4,436,815; 4,431,740; 4,431,739; 4,428,941; 4,425,437; 4,418,149; 4,411,994; 4,366,246; 4,342,833; see also U.K. Patent Applications GB 2,121,054; GB 2,008,123; GB 2,007,675; and European Patent Application 103,396. Yeast expression vectors are also known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,446,235; 4,443,539; 4,430,428; see also European Patent Applications 103,409; 100,561; 96,491. pSV2neo (as described in J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341) which uses the SV40 late promoter to drive expression in mammalian cells or pCDNA1neo, a vector derived from pCDNA1(Mol. Cell Biol. 7:4125-29) which uses the CMV promoter to drive expression. Both these latter two vectors can be employed for transient or stable (e.g. using G418 or hygromycin resistance) expression in mammalian cells. Insect cell expression systems, e.g., *Drosophila*, are also useful, see for example, PCT applications US 89/05155 and US 91/06838 as well as EP application 88/304093.3 and Baculovirus expression systems.

Depending on the expression system and host selected, the proteins of the present invention are produced by growing host cells transformed by an expression vector described above under conditions whereby the protein of interest is expressed. The protein is then isolated from the host cells and purified. If the expression system secretes the protein into growth media, the protein can be purified directly from the media. If the protein is not

整理番号 159287

secreted, it is isolated from cell lysates or recovered from the cell membrane fraction. The selection of the appropriate growth conditions and recovery methods are within the skill of the art.

5 An alternative method to identify proteins of the present invention is by constructing gene libraries, using the resulting clones to transform *E. coli* and pooling and screening individual colonies using polyclonal serum or monoclonal antibodies to the desired binding protein.

10 The proteins of the present invention may also be produced by chemical synthesis such as solid phase peptide synthesis, using known amino acid sequences or amino acid sequences derived from the DNA sequence of the genes of interest. Such methods are known to those skilled in the art. Chemical synthesis of peptides is not particularly preferred.

#### assays

15 This invention also provides a method for determining whether a ligand previously unknown to bind to a CSBP $\beta$  can bind to such a protein. The method comprises contacting the ligand to be identified with cytosolic fraction from mammalian cells and measuring its ability to compete with a known radioactive CSAID, in a CSAIDs binding assay (Lee et. al Nature 372:739-746; and previous CSBP filings). Alternative methods include contacting the ligand to be identified with a whole-cell expressing the coding sequence of a CSBP $\beta$  under conditions sufficient for binding of ligands previously identified as binding to such a receptor. In other 20 embodiments cell membrane or cytosolic fractions comprising CSBP $\beta$  fusions or isolated CSBP $\beta$  free or immobilized on solid supports may be used to measure binding of the ligand to be tested. When recombinant cells are used for purposes of expression of the CSBP $\beta$  it is preferred to use cells with little or no endogenous CSBP $\beta$  activity so that binding if any is due to the presence of the expressed protein of interest. Alternatively, the CSBP $\beta$  is engineered as 25 a fusion to a peptide or protein fragment allowing separation from endogenous cellular proteins which might contribute to binding. As mentioned previously, a specifically designed indicator of receptor binding can be constructed. For example a fusion protein can be made by fusing the CSBP $\beta$  of this invention with a protein domain which is sensitive to CSBP $\beta$ /ligand binding. Such a domain referred to here as an indicator domain is capable, itself, or in association with accessory molecules, of generating an analytically detectable signal which is 30 indicative of receptor ligand binding. A variation of this approach is to express CSBP $\beta$  as a fusion protein (e.g., fused to FLAG peptide) in THP.1 or other mammalian cells, and to use the fusion peptide as a means of isolating the recombinant CSBP $\beta$  after suitable stimulation

整理番号 159287

and pretreatment of THP.1 cells. Such expression can be achieved with numerous mammalian expression vectors which utilize viral promoters, eg CMV, RSV and polyadenylation sequences, et. SV40, bovine growth hormone, and a selectable marker such as G418 or hygromycin for selection of stable transfectants.

5 Cytosolic preparations from transfected or transformed cells expressing such fusions may be employed. All of the above techniques that are useful for ligand identification are also useful in drug screening and drug development protocols.

Alternatively, the purified recombinant protein could be used to substitute for crude THP.1 cell lysates in a competitive binding assay with SB 202190 or a related compound  
10 (Lee et al., Nature 372:739-746). This assay is useful to screen for novel compound which bind CSBP $\beta$ , or as a way to assess alterations to compound which is known to bind. The availability of purified protein allows alternative configurations of the assay from those described previously for the crude material. For example, if the protein is covalently linked to a tag, such a protein binding site for configuration in a colorimetric assay, e.g., conjugated  
15 antibody, or to an enzyme for direct detection of enzyme activity, e.g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase, binding to novel compounds displayed on a solid matrix could be detected. Such compounds could include low molecular weight organic molecules, peptides, polypeptides, and proteins. In the latter case, the protein can be used as a way to isolate other proteins in its signaling cascade, for example, those that are in the pathway for activation of  
20 cytokine translation in activated monocytes. The protein may also be used to isolate naturally occurring regulatory molecules within mammalian cells that act by a CSAID $\beta$  binding mechanism. Finally, the protein can be used to identify target peptides displayed on the surface of phage.

The knowledge that the CSBP $\beta$  encodes protein kinases suggests that recombinant  
25 forms can be used to establish a protein kinase activity. Typically this would involve the direct incubation of CSBP $\beta$  with a protein or peptide substrate in the presence of  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, followed by the measurement of radioactivity incorporated into the substrate by separation and counting. Separation methods include immunoprecipitation, conjugation of substrate to a bead allowing separation by centrifugation or determination of incorporation by scintillation  
30 proximity assay, SDS-PAGE followed by autoradiography or biosensor analysis. While the specific substrates are not yet known, candidates include CSBP $\beta$  itself (autophosphorylation), myosin basic protein, ATF2, MAPKAP kinase-2, MAPKAP kinase-3 (see McLaughlin et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:8488-8492 and references therein) and peptides related to known

整理番号 159287

MAP kinase substrates. Other substances might be discovered by incubating CSBP $\beta$  with random peptides conjugated to solid supports or displayed by phage (see above) or by incubation of CSBP $\beta$  with mammalian cell lysates (e.g. THP.1 cell lysates) and  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP, followed by separation of the labelled target proteins, and sequencing. Kinase activity may also be detected by use of antiphosphotyrosine antibodies. The protein kinase activity of CSBP $\beta$  may require incubation with a specific MAP kinase kinase. This may be achieved by preincubating CSBP $\beta$  with lysates from stimulated eukaryotic cells (e.g., LPS treated THP.1 cells) and ATP. Alternatively, it may be possible to isolate a more active form of CSBP $\beta$  from HOG1 deletion strains of yeast expressing the human CSBP $\beta$  and grown in high osmolarity conditions (see for example Kumar et al., (1995) J. Biol. Chem. 270:29043-29046).

These assays permit the discovery and modification of compounds which inhibit CSBP $\beta$  kinase activity in vitro, a known property of CSAIDS (Lee, et al., *Nature*, supra). Such compounds will block cytokine synthesis in a comparable fashion to the compounds described herein. They could also lead to the discovery of novel substrates which themselves may be viable targets for discovery of novel compounds which block cytokine production.

It is expected that CSBP $\beta$ s, like other MAP kinases, will be activated by a MAP kinase kinase, hence the recombinant protein would allow the establishment of a second assay which measures the ability of CSBP $\beta$  to be phosphorylated by putative MAP kinase kinases. In this case fractions from stimulated cell lysates (eg THP.1 cells stimulated with LPS) are incubated with CSBP $\beta$  in the presence of  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP, and the incorporation of  $^{32}$ P-label into CSBP $\beta$  measured by separation and counting. Separation can be achieved in a number of ways: one way is to use a CSBP $\beta$  fused to a peptide or protein and separate via affinity chromatography or immunoprecipitation with the peptide or protein directed antibody. Alternatively, the CSBP $\beta$  can be directly conjugated to beads or bound through a fusion peptide or protein (e.g., FLAG (peptide), glutathione-S-transferase) and separated by centrifugation after incubation with cell lysates. Also tyrosine phosphorylation of CSBP $\beta$  could be detected by immunoprecipitation or immunoblot with commercially available anti-phosphotyrosine antibodies.

These assays can be used to discover compounds which block the activation of CSBP $\beta$  protein kinase activity and to improve the potency of already discovered compounds.

整理番号 159287

These compounds would be expected to have utility due to their blocking of cytokine synthesis.

The ability of human CSBP $\beta$  to rescue a HOG1 deletion strain upon growth in conditions of high osmolarity allows for the direct screening of compounds which block CSBP $\beta$  activity in vivo. For example, compounds could be screened for their ability to block growth of a CSBP $\beta$  +/HOG1- yeast strain in high osmolarity but which have no effect on growth of the same strain in standard osmolarity or on a CSBP $\beta$ -(HOG1)+ in high osmolarity. The sensitivity of the yeast based assay can be increased by introducing host mutations that affect the cell membrane and permeability (Gaber, et al., *Mol. Cell. Biol.* 9: 3447-3456. (1989)).

In a compound screening embodiment of this invention, the CSBP $\beta$  in isolated, immobilized or cell bound form is contacted with a plurality of candidate molecules and those candidates are selected which bind to and interact with the protein. The binding or interaction can be measured directly by using radioactively labeled candidate of interest or indirectly by measuring an effect resulting from the interaction or binding of the candidate compound. Alternatively, the candidate compounds can be subjected to a competition screening assays, in which a known ligand, preferably labeled with an analytically detectable reagent, most notably radioactivity, is introduced with the compounds to be tested and the compound's capacity to inhibit or enhance the binding of the labeled ligand is measured. Compounds are screened for their increased affinity and selectivity for the CSBP $\beta$ .

To illustrate this aspect of the invention, a natural product screen may be performed.

The standard assay in which bound ligand is separated from free by exclusion chromatography using mini-columns is used to initiate a screening effort. Marine extracts, microbial extracts and extracts of plant material may be tested for inhibition of a  $^3\text{H}$ -CSAID binding to TBP.1 cytosol. Extracts are confirmed as antagonists if binding is characterized by IC<sub>50</sub>'s of around 80-200  $\mu\text{g/ml}$ . A low hit-rate coupled with the failure to observe inhibition by any of a selected group of "nuisance extracts" indicates that the assay is sufficiently selective and robust to support a screening effort.

Further refinement of the binding assay to facilitate high throughput screening can be achieved by the minor modification of separating bound ligand from free ligand using spin columns.

Inhibitors

整理番号 159287

The discovery that the CSBP $\beta$  of this invention is homologous to the CSBP-MAP kinase family of serine-threonine protein kinases provides a specific rationale for the treatment of a wide variety of acute and chronic inflammatory diseases. Accordingly, it is a further aspect of this invention to treat patients suffering from the effects of cytokine-mediated inflammatory disease with a CSBP $\beta$  inhibitory amount of a CSAID. Illustrative examples of such diseases include, without limitation, diseases associated with the central nervous system such as acute dementia of the Alzheimer's type (SDAT), multiple sclerosis, cerebral malaria, stroke, head trauma and spinal cord injury; cardiovascular diseases such as restenosis and atherosclerosis; inflammatory diseases such as Adult Respiratory Disease Syndrome (ARDS), Rheumatoid arthritis, Osteoarthritis, Inflammatory Bowel Disease (IBD), psoriasis, dermatitis, asthma; and other such diseases or conditions associated with dysregulated or excess cytokines such as osteoporosis, sepsis due to surgical or traumatic incident, chronic renal failure, AIDS, cachexia and autoimmune conditions such as lupus erythematosus, host graft rejection and graft versus host disease. Thus this invention contemplates the treatment and/ or amelioration of such disease by administering a CSBP $\beta$  inhibiting amount of a compound. Without wishing to be bound by any particular theory of the functioning of the CSBP $\beta$ s of this invention, it is believed that among the useful inhibitors of CSBP $\beta$  function are those compounds which inhibit the kinase activity of the CSBP $\beta$ s. Other sites of inhibition are, of course, possible owing to its position in a signal transduction cascade. Therefore, inhibiting the interaction of CSBP $\beta$  with one or more of its upstream or downstream substance is also contemplated by this invention.

compositions/administration

This invention also contemplates pharmaceutical compositions comprising compounds when identified by the above methods and a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutical compositions of proteinaceous drugs of this invention are particularly useful for parenteral administration, i.e., subcutaneously, intramuscularly or intravenously. The compositions for parenteral administration will commonly comprise a solution of the compounds of the invention or a cocktail thereof dissolved in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers may be employed, e.g., water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, and the like. These solutions are sterile and generally free of particulate matter. These solutions may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH

整理番号 159287

adjusting and buffering agents, etc. The concentration of the compound of the invention in such pharmaceutical formulation can vary widely, i.e., from less than about 0.5%, usually at or at least about 1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, etc., according to the particular mode of administration selected.

5 Thus, a pharmaceutical composition of the invention for intramuscular injection could be prepared to contain 1 ml. sterile buffered water, and 50 mg of a compound of the invention. Similarly, a pharmaceutical composition of the invention for intravenous infusion could be made up to contain 250 ml of sterile Ringer's solution, and 150 mg of a compound of the invention. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions are  
10 well known or will be apparent to those skilled in the art and are described in more detail in, for example, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

The compounds described herein can be lyophilized for storage and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional  
15 proteins and art-known lyophilization and reconstitution techniques can be employed.

In situations where the identified drug is non-proteinaceous, it may be administered alone or in combination with pharmaceutically acceptable carriers. The proportion of which is determined by the solubility and chemical nature of the compound, chosen route of administration and standard pharmaceutical practice. For example, they may be administered  
20 orally in the form of tablets or capsules containing such excipients as starch, milk sugar, certain types of clay and so forth. They may be administered sublingually in the form of troches or lozenges in which the active ingredient is mixed with sugar and corn syrups, flavoring agents and dyes; and then dehydrated sufficiently to make it suitable for pressing into a solid form. They may be administered orally in the form of solutions which may be  
25 injected parenterally, that is, intramuscularly, intravenously or subcutaneously. For parenteral administration, they may be used in the form of a sterile solution containing other solutes, for example, enough saline or glucose to make the solution isotonic.

The physician will determine the dosage of the present therapeutic agents which will be most suitable and it will vary with the form of administration and the particular compound  
30 chosen, and furthermore, it will vary with the particular patient under treatment. The physician will generally wish to initiate treatment with small dosages substantially less than the optimum dose of the compound and increase the dosage by small increments until the optimum effect under the circumstances is reached. It will generally be found that when the

整理番号 159287

composition is administered orally, larger quantities of the active agent will be required to produce the same effect as a smaller quantity given parenterally. The compounds are useful in the same manner as other serotonergic agents and the dosage level is of the same order of magnitude as is generally employed with these other therapeutic agents. The therapeutic dosage will generally be from 1 to 10 milligrams per day and higher although it may be administered in several different dosage units. Tablets containing from 0.5 to 10 mg. of active agent are particularly useful.

Depending on the patient condition, the pharmaceutical composition of the invention can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In therapeutic application, compositions are administered to a patient already suffering from a disease in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the disease and its complications. In prophylactic applications, compositions containing the present compounds or a cocktail thereof are administered to a patient not already in a disease state to enhance the patient's resistance.

Single or multiple administrations of the pharmaceutical compositions can be carried out with dose levels and pattern being selected by the treating physician. In any event, the pharmaceutical composition of the invention should provide a quantity of the compounds of the invention sufficient to effectively treat the patient.

probes

The nucleic acid embodiment of this invention is particularly useful in providing probes capable of specific hybridization with human CSBP sequences. Probing technology is well known in the art, and it is appreciated that the size of the probes can vary widely, but it is preferred that the probe be at least 15 nucleotides in length. It is also appreciated that such probes can be, and are preferably, labeled with an analytically detectable reagent to facilitate identification of the probe. Useful reagents include, but are not limited to, radioactivity, fluorescent dyes or enzymes capable of catalyzing the formation of a detectable product. This invention contemplates, for example using receptor encoding probes in the diagnostic evaluation of disease states characterized by an abnormal, i.e. increased or decreased level of receptor gene expression. Alternatively, the probes can be used to identify individuals carrying chromosomal or molecular mutations in the gene encoding the receptor. Depending on the conditions employed by the ordinary skilled artisan, the probes can be used to identify and recover additional examples of this receptor (in its genomic or cDNA form)

整理番号 159287

from other cell types and individuals. As a general rule, the more stringent the hybridization conditions, the more closely related the genes will be that are recovered.

#### antisense

Also within the scope of this invention are antisense oligonucleotides predicated upon  
5 the sequences disclosed herein for the CSBP $\beta$ . Synthetic oligonucleotides or related antisense chemical structural analogs are designed to recognize and specifically bind to a target nucleic acid encoding the receptor gene and inhibit gene expression, e.g., the translation of the gene when the target nucleic acid is mRNA. Although not wishing to be bound to a particular theory for the mechanism of action of antisense drugs, it is believed that such drugs can act  
10 by one or more of the following mechanisms: by binding to mRNA and inducing degradation by exogenous nucleases such as RNase I or by inhibiting the translation of mRNA by inhibiting its binding to regulatory factors or ribosomal components necessary for productive protein synthesis. Additionally, the antisense sequences can be use as components of a complex macromolecular arrays in which the sequences are combined with ribozyme  
15 sequences or reactive chemical groups and are used to specifically target mRNAs of interest and degrade or chemically modify said mRNAs. The general field of antisense technology is illustrated by the following disclosures, which are incorporated herein by reference for purposes of background (Cohen, J.S., Trends in Pharm. Sci. 10:435 (1989) and Weintraub, H.M. Scientific American Jan. (1990) at page 40).

#### gene therapy

This invention also contemplates the use of the DNA sequences disclosed herein in  
gene therapy. Because CSBP $\beta$  is a protein kinase, it is possible to make a site specific mutant which is inactive as a kinase, but will block activation of the endogenous CSBP $\beta$  when coexpressed in the same cell, i.e., it is a dominant negative mutant (Kolch et al., Nature  
25 349: 426-428 (1991)). The DNA encoding this mutant protein could be used in gene therapy to reduce chronic inflammation. There are many vector and delivery systems available to direct DNA into target cells *in vivo*, e.g. adenovirus, retroviruses.

#### antibodies

30 This invention also contemplates antibodies, monoclonal or polyclonal directed to epitopes corresponding to amino acid sequences disclosed herein from the CSBP $\beta$ . Particularly important regions of the receptor for immunological purposes are those regions associated with ligand binding domains of the protein. Antibodies directed to the regions are

整理番号 159287

particularly useful in diagnostic and therapeutic applications because of their effect upon protein-ligand interaction. Methods for the production of polyclonal and monoclonal antibodies are well known, see for example Chap. 11 of Ausubel et al. (*supra*).

5 This invention also provides pharmaceutical compositions comprising an effective amount of antibody or fragment thereof directed against the CSBP $\beta$  to block binding of the naturally occurring ligands to that protein in order to treat or ameliorate disease states associated with protein activation.

10 The binding proteins of the present invention or their fragments comprising at least one epitope can be used to produce antibodies, both polyclonal and monoclonal. If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal, (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunized with a binding protein of the present invention, or its fragment, or a mutated binding protein. Serum from the immunized animal is collected and treated according to known procedures. When serum containing polyclonal antibodies is used, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography or other known procedures.

15 Monoclonal antibodies to the proteins of the present invention, and to the fragments thereof, can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by using hybridoma technology is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. See, e.g., M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); see also U.S. Patent Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,452,570; 4,466,917; 4,472,300; 4,491,632; and 4,493,890. Panels of monoclonal antibodies produced against the protein of interest, or fragment thereof, can be screened for various properties; i.e., for isotype, epitope, affinity, etc. Alternatively, genes encoding the monoclonals of interest may be isolated from the hybridomas by PCR techniques known in the art and cloned and expressed in the appropriate vectors. Monoclonal antibodies are useful in purification, using immunoaffinity techniques, of the individual proteins against which they are directed. The antibodies of this invention, whether polyclonal or monoclonal have additional utility in that they may be employed reagents in immunoassays, RIA, ELISA, and the like. In addition they can be used to isolate the CSBP $\beta$  from human cells and determine the effect of different stimuli and compounds on the phosphorylation state and protein kinase activity of endogenous CSBP $\beta$ . The antibodies could be used to establish a tissue culture

20

整理番号 159287

based assay for discovery or modification of novel compounds which block the phosphorylation or kinase activity of CSBP $\beta$ . An example of such an assay would be to incubate human cell lines expressing CSBP $\beta$  with a compound or compound mixture prior to treatment with a suitable LPS stimulus (e.g., LPS, osmotic stress) for a defined time period, followed by immunoprecipitation of CSBP $\beta$  with antibody and assessment of its phosphorylation state via immunoblot or chromatography or measurement of its kinase activity with appropriate protein or peptide substrate.

#### transgenics

Transgenic, non-human, animals may be obtained by transfecting appropriate fertilized eggs or embryos of a host with nucleic acids encoding the CSBP $\beta$  disclosed herein, see for example U.S. Patents 4,736,866; 5,175,385; 5,175,384 and 5,175,386. The resultant transgenic animal may be used as a model for the study of CSBP $\beta$ /ligand interaction. Particularly, useful transgenic animals are those which display a detectable phenotype associated with the expression of the protein. Drugs may then be screened for their ability to reverse or exacerbate the relevant phenotype. This invention also contemplates operatively linking the CSBP $\beta$  coding gene to regulatory elements which are differentially responsive to various temperature or metabolic conditions, thereby effectively turning on or off the phenotypic expression in response to these conditions.

The nucleic acid probes disclosed herein can be used to clone the cognate version of the human CSBP $\beta$  gene from a desired experimental animal species; for example the murine version. Strains of mice can be developed in which said gene has been eliminated by conventional gene knock-out technology. The gene can then be substituted or replaced by the human CSBP $\beta$  DNA of this invention to yield a mouse for screening candidate drugs *in vivo*. Similar gene knockout and human protein inhibition studies can also be performed with yeast.

#### EXAMPLES

The present invention is further described by the following examples. The examples are provided solely to illustrate the invention by reference to specific embodiments. These exemplification's, while illustrating certain specific aspects of the invention, do not portray the limitations or circumscribe the scope of the disclosed invention.

Certain terms used herein are explained in the foregoing glossary.

整理番号 159287

All examples are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. Routine molecular biology techniques of the following examples can be carried out as described in standard laboratory manuals, such as Sambrook *et al.*

5

#### Example 1 - Tissue distribution

A Northern blot was conducted with a partial CSBP $\beta$  cDNA above on a human multiple tissue Northern from Clontech. Conditions used have been reported previously (Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D.,  
10 Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Simons, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., and Young, P. R. (1994) *Nature* 372, 739-746). CSBP $\beta$  was expressed most abundantly in human testis, with lower expression in pancreas, prostate and small intestine. Weak expression was noted in spleen, thymus, PBL, and skeletal muscle.

整理番号 159287

Example 2 - Homology to MAP kinase family and expression

CSBP $\beta$  is a member of the MAP kinase family of serine-threonine protein kinases (Marshall, C. I. (1994) *Curr. Opin. Genet. Develop.* 4, 82-89). Members of the MAP kinase family are characterized by having a "TXY" amino acid motif (T=Threonine, Y=tyrosine and X is any amino acid) in an activation loop near to the active site. Phosphorylation of both the tyrosine and threonine by a MAP kinase kinase in response to an appropriate stimulus is required for the activation of MAP kinase activity. There are three families of MAP kinases which are distinguished by the nature of the "x" amino acid and the size of the activation loop (Cano, E., and Mahadevan, L. C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122). Hence, the erks have TEY, JNK/SAPKs have TPY and the CSBP/p38s have TGY. These differences reflect differences in the activating MAP kinase kinases and in the cellular stimuli which activate each MAP kinase. Within each family, the activating stimuli appear to be very similar. Thus the erks respond mostly to mitogenic stimuli (e.g., EGF, PDGF), while the JNK/SAPKs and CSBP/p38s respond to several cellular stresses (eg UV, osmotic, heat or chemical stress, hypoxia, oxidants etc) and proinflammatory stimuli (e.g., LPS, IL-1, TNF, etc.).

Recently, several new forms of CSBP have been identified. In addition to the two splice variants of CSBP, CSBP1 and CSBP2, a further spliced variant was identified through a yeast two-hybrid interaction screen with the nuclear protein Max (Zervos, A. S., Faccio, L., Gatto, J. P., Kyriakis, J. M., and Brent, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10531-10534). Two homologues with significant amino acid identity which also retain the "TGY" motif characteristic of the CSBP family were also recently identified: p38 $\beta$  (Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J. (1995) *J. Biol. Chem.* 271, 17920-17926), and ERK6/SAPK3 (Lecuyer, C., Zahalka, M. A., Giot, J.-F., Moller, N. P. H., and Ullrich, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4355-4359; Mertens, S., Craxton, M., and Goedert, M. (1996) *FEBS Lett.*, (in press).

CSBP $\beta$  may be engineered for yeast expression in a similar manner to that previously described for CSBP1 and CSBP2 (Kumar, S., McLaughlin, M. M., McDonnell, P. C., Lee, J. C., Livf, G. P., and Young, P. R. (1993) *J. Biol. Chem.* 270, 29043-29046). An XhoI site is engineered at the initiation codon of CSBP $\beta$  by the polymerase chain reaction (Mullis and Faloona, Meth. Enzymol. 155:335-50 (1987)). An XhoI/BglII fragment containing CSBP $\beta$  is

整理番号 159287

then ligated into the same sites in p138NDU, a modification of p138NB (McHale et al. Mol. Pharm. 39:109-113 (1991)) in which the Trp selectable marker is replaced with URA3. Alternatively, the amino terminus of CSBPβ can be fused to an epitope tag such as the FLAG epitope (for which reagents are available from IBI-Kodak) by using a polymerase chain reaction which includes an XhoI site, the FLAG epitope and the amino terminal nucleotide sequence of CSBPβ.

CSBPβ can also be engineered for expression in mammalian cells such as HeLa and JURKAT by fusing the amino terminus of CSBPβ with a FLAG epitope. An XbaI/XhoI restriction fragment containing the complete open reading frame of human CSBPβ was excised from the Bluescript plasmid in which it was originally cloned, and inserted into the vector pSPORT (GIBCO-BRL) cut with XbaI and SalI. The resulting vector pSPORT-CSBPβ was then cut with SacI and BamHI and ligated with a synthetic oligonucleotide linker prepared by hybridizing together the following two oligonucleotides: 5' GAT CCG GTA CCA TGG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAA GCC TCA TCC GGA AAA AGG GCT TCT ACA AGC ACG AGC T - 3' (SEQ ID NO: 3) and 5'-CCT GCT TGT AGA AGC CCT TTT TCC GGA TGA GGC TTT TAT CAT CAT CAT CTT TAT AAT CCA TGG TAC CG - 3' (SEQ ID NO: 4) to create pSPORT-FLAGCSBPβ. The entire FLAG-CSBPβ fusion was then excised from pSPORT-FLAG CSBPβ on a HindIII/SmaI restriction fragment, and ligated into pCDN cut with HindIII and EcoRV to create pCDN-FLAGCSBPβ. This could then be transfected into mammalian cells such as HeLa or JURKAT using a number of established protocols, eg lipofectamine (GIBCO-BRL). Treatment of cells with a suitable stimulus (eg osmotic shock, UV, IL-1) leads to activation of the FLAG-CSBPβ, and CSAID binding can be detected through the ability of CSAIDs to inhibit the kinase activity of CSBPβ. Thus, FLAG CSBPβ can be immunoprecipitated from transfected mammalian cells with antibodies to the FLAG epitope (IBI-Kodak), and an in vitro kinase assay can be performed with a suitable substrate (eg myelin basic protein, MAPKAP kinase-2 or -3) in the presence or absence of CSAID as previously described (Lee et al., (1994) Nature 372:739-746; McLaughlin et al. J. Biol. Chem. 271:8488-8492 (1996)).

整理番号 159287

Example 1 Expression in E. coli:

To confirm that the proteins encoded by the isolated cDNAs of this invention can bind to CSAIDs, the cDNA may be expressed in *E. coli*, yeast and mammalian cells (e.g., HeLa, CHO, 3T3). In *E. coli* the CSBPs are expressed as fusion proteins, for example, with  
5  $\beta$ -galactosidase, an enterokinase cleavable FLAG epitope tag, glutathione S-transferase or a hexahistidine tail. (FLAG is a commercial epitope for which reagents are available through ID3-Kodak). In the latter case this is achieved by the design of a synthetic oligonucleotide linker with an initiation site, antibody recognition sequence, and enterokinase cleavage site. Proteins are expressed under the control of either the pLac (e.g., Bluescript KS vector from  
10 Stratagene, LaJolla, CA.) or ApL (Shatzman, et al., N.Y. Acad. Sci., 478: 233-248 (1986)) promoters and probed with a radiophotaffinity CSAIDs shown to specifically crosslink proteins of the expected sizes in cell lysates.

Protein expressed in *E. coli* is purified by passage over an affinity matrix containing a monoclonal antibody to the FLAG epitope, glutathione beads or a NINTA column  
15 according to manufacturer's instructions.

整理番号 159287

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION

(i) APPLICANT: McDonnell, Peter  
Young, Peter

(ii) TITLE OF THE INVENTION: DRUG BINDING PROTEIN

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

## (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: SmithKline Beecham Corporation  
(B) STREET: 709 Swedeland Road  
(C) CITY: King of Prussia  
(D) STATE: PA  
(E) COUNTRY: USA  
(F) ZIP: 19406-0939

## (v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Diskette  
(B) COMPUTER: IBM Compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: DOS  
(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 3.5

## (vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:  
(C) CLASSIFICATION:

## (vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: 08/468,952  
(B) FILING DATE: 06-JUN-1995

(A) APPLICATION NUMBER: 08/123,175  
(B) FILING DATE: 17-SEP-1993

(A) APPLICATION NUMBER: 08/250,975  
(B) FILING DATE: 31-MAY-1994

整理番号 159287

## (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: Schreck, Patricia A
- (B) REGISTRATION NUMBER: 33,777
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: ATO55036

## (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: 610-270-5031
- (B) TELEFAX: 610-270-5090
- (C) TELEX:

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

## (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1828 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (iii) HYPOTHETICAL: NO

## (iv) ANTISENSE: NO

## (v) FRAGMENT TYPE:

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

```

GCACGAGGCG AGGCGCCACG CCGGGGCCCGC KXAGATCGGG TCGCCCGGAT GAGCCTCATT 60
CGGAAAGAGG GCTTCTACAA SCAGGAGCTC AACAGACCG CCGCGGAGCT GCGCAGAGAC 120
TACGTCCTCC CGAGCGACCT ONCCAGCGCG GCTTATGCGT CCGGCTGCTC GCGCATCGAC 180
AAGCGCTGCG GCGAGAGAGT GCGCATCAAG AAGCTGAGCC GACGCTTTCA GTCCGAGATT 240
TTGCGCAAGC GCGGCTAGCG GCGGCTGCTG CTGCTGAGGC ACATGACGCA TGAGAACCTC 300
ATGCGGCTCC TGATATGTTT CAGCCGAGCC TCGTCCCTGC GCACTTCTTA TGACTTCTAC 360
CTGCTGAGTC CTTTCATGCA GAGCGATCTG CAGAGATCTA TGGGATGCA GTTCAGTGAG 420
GAGAGATATC AGTACCTGCT GTATCAGATG CTCAGAGGCG TTAGCTACAT CCACTCTGCT 480
GCGGCTGCTG AGCGGAGCTT GAGCGGAGCG AACCTGGCTG TTAGTGAGGA CTGTGAAGTC 540
AAGATTTTGG ATTTTGGGCT GCGGCGAGAT GCGAGGCGCG AGTGAAGTGG CTACGTTGTT 600
ACCGGCTGCT ACCGAGCGCG GAGGCTGATC CTCAGCTGGA TGCACTACAA CCGAGAGTGG 660
GCGATCTGCT CCGTGGGCTG TATCATGGCA GAGATGCTGA CAGGGAAGAG TCGTTTCAAG 720
GCGAAGAGTT ACCGAGCTA GCTGAGCGAG ATCTTGAAGT TCGCGGCTG GCGTGGCAGC 780
CGGTTTGTGC AGAGCTGAA CGAGAGAGCG GCGAATGCTT ACATTCAGTC CCGGCGAGAG 840
ACCGCGAGGA AGGATTTGAC TCAGCTGTTT CAGGCGGCGA GCGCGGAGGT TCGGAGCTGT 900
CTGAGAGAGA TGCTGAGCTT AGAGCTGAGC AAGCGGCTGA GCGCGGCGCA GCGGCTGAGC 960

```

整理番号 159287

```

CATCCCTTCT TTGAACCCCT CCGGACCCCT GAGGAAGAGA CCGAGGCCCA GCAGCCCTTT 1020
GATGATTCCT TAGAACACCA GAATTCACA GTGCTGALT GGAAGCAGCA CATCTACAA 1080
GAGATGTGA ACTTCAGCCC CATTGCCCCG AAGGACTCAC GGCXKCGAG TGGCATGAA 1140
CTGTAGGAC TCATCTTGA TGGCAGCCG GGCAGACAC TGCCAGGA CAGTATTTG 1200
TCACTACCAA ACTCAGCCCT TTTTGAATA CAGCCTTTCA AGCAGGAGC AGAGGGGTC 1260
TTCTCTTAT GTGGGAATG GGCCTAGTAG ATCCAGGAT CAAAGATGT GGTTCGGGA 1320
AATAGCTCT GATCTAACA GGCACGTTA AACTGCCAT CTCGAGATC GCTTCAGGT 1380
GGGCCCCCTT CCTTCCGCC AGAAGTGGG TGGTGGGGG CTGAGCCAG CCGGGGGCT 1440
ATGACAGTA TGTCTTCTG GTTTCCTAG GATGCTCTA CCAATTACCA CAAACCTGG 1500
GGATTTGAA AGCAGAACTT GATTCCTTA CATTCTGGA GGTTCGAAAT TTGGCATGA 1560
GGTTCGGA GGGCTGTGT CCGTTTGAAG GCTCTGGGA AGATTCCTT CTTCCTCTT 1620
TTTACTTGT GCGGCGAGT GGCAGTGGT GCGATTCCT AGTTATTCG TGATCACTC 1680
CACTCTCTT CTCTCTCTT CTCTCTCTT TTAACAACG TCATTGATT TAGGCCCCAC 1740
CCATATCTG TGTGATTTA TTTGATCTT TATTAATTA AACTGCAAT ACTCTATTC 1800
CAATATAGT CACATCTCA GGTTCAGGT GGCATGA 1860

```

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 365 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: peptide

## (iii) HYPOTHETICAL: NO

## (iv) ANTISENSE: NO

## (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

```

Met Ser Leu Ile Arg Lys Lys Gly Phe Tyr Lys Gln Glu Leu Asn Lys
1           5           10           15
Thr Ala Trp Glu Leu Pro Lys Thr Tyr Val Ser Pro Thr His Val Gly
20           25           30
Ser Gly Ala Tyr Gly Ser Trp Cys Ser Ala Ile Asp Lys Arg Ser Gly
35           40           45
Glu Lys Val Ala Ile Lys Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Glu Ile
50           55           60
Phe Ala Lys Arg Ala Tyr Arg Glu Leu Leu Leu Lys His Met Gln
65           70           75           80
His Glu Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Ser Ser
28

```

整理番号 159287

85	90	95
Leu Arg Asn Phe Tyr Asp Phe Tyr Leu Val Met Pro Phe Met Gln Thr		
100	105	110
Asp Leu Gln Lys Ile Met Gly Met Glu Phe Ser Glu Glu Lys Ile Gln		
115	120	125
Tyr Leu Val Tyr Gln Met Leu Lys Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala		
130	135	140
Gly Val Val His Arg Asp Leu Lys Pro Gly Asn Leu Ala Val Asn Glu		
145	150	155
Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Ala Asp		
165	170	175
Ala Glu Met Thr Gly Tyr Val Val Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu		
180	185	190
Val Ile Leu Ser Trp Met His Tyr Asn Gln Thr Val Asp Ile Trp Ser		
195	200	205
Val Gly Cys Ile Met Ala Glu Met Leu Thr Gly Lys Thr Leu Phe Lys		
210	215	220
Gly Lys Asp Tyr Leu Asp Gln Leu Thr Gln Ile Leu Lys Val Thr Gly		
225	230	235
Val Pro Gly Thr Glu Phe Val Gln Lys Leu Asn Asp Lys Ala Ala Lys		
245	250	255
Ser Tyr Ile Gln Ser Leu Pro Gln Thr Pro Arg Lys Asp Phe Thr Gln		
260	265	270
Leu Phe Pro Arg Ala Ser Pro Gln Ala Ala Asp Leu Leu Glu Lys Met		
275	280	285
Leu Glu Leu Asp Val Asp Lys Arg Leu Thr Ala Ala Gln Ala Leu Thr		
290	295	300
His Pro Phe Phe Glu Pro Phe Arg Asp Pro Glu Glu Glu Thr Glu Ala		
305	310	315
Gln Gln Pro Phe Asp Asp Ser Leu Glu His Gln Lys Leu Thr Val Asp		
325	330	335
Glu Trp Lys Gln His Ile Tyr Lys Glu Ile Val Asn Phe Ser Pro Ile		
340	345	350
Ala Arg Lys Asp Ser Arg Arg Arg Ser Gly Met Lys Leu		
355	360	365

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

## (1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 76 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

整理番号 159287

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA  
 (iii) HYPOTHETICAL: NO  
 (iv) ANTISENSE: NO  
 (v) FRAGMENT TYPE:  
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CAATCCGCTC CATGGATTAT AAGATGATG ATATATAAG CCTCTCCG AAGAGGGCT 60  
 TCTCAAGTA GGAGCT 76

(x) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
 (A) LENGTH: 68 base pairs  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA  
 (iii) HYPOTHETICAL: NO  
 (iv) ANTISENSE: NO  
 (v) FRAGMENT TYPE:  
 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

CCTGCTTCTA GAAGCCTTT TTCCGGATGA GCTTTTATC ATCATCATCT TTATAATCCA 60  
 TGGTACG 68

整理番号 159287

## WHAT IS CLAIMED IS

1. An isolated polynucleotide comprising a member selected from the group consisting of:
  - (a) a polynucleotide having at least a least 75% identity to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising amino acids of SEQ ID NO: 2;
  - (b) a polynucleotide which by virtue of the redundancy of the genetic code, encodes the same amino acids of SEQ ID NO: 2;
  - (c) a polynucleotide which is complementary to the polynucleotide of (a) or (b); and
  - (d) a polynucleotide comprising at least 15 contiguous bases of the polynucleotide of (a), (b) or (c).
2. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is DNA.
3. The polynucleotide of Claim 1 wherein the polynucleotide is RNA.
4. The polynucleotide of Claim 2 comprising nucleotides set forth in SEQ ID NO: 1.
5. The polynucleotide of Claim 2 comprising nucleotides 1-1838 set forth in SEQ ID NO: 1.
6. The polynucleotide of Claim 2 which encodes a polypeptide comprising amino acids of SEQ ID NO: 2.
7. A vector comprising the DNA of Claim 2.
8. A host cell comprising the vector of Claim 7.
9. A process for producing a polypeptide comprising expressing from the host cell of Claim 8 a polypeptide encoded by said DNA.
10. A process for producing a cell which expresses a polypeptide comprising transforming or transfecting the cell with the vector of Claim 7 such that the cell expresses the polypeptide encoded by the human cDNA contained in the vector.
11. A polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 80% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.
12. A polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.
13. An agonist to the polypeptide of claim 11.
14. An antibody against the polypeptide of claim 11.
15. An antagonist to the polypeptide of claim 11.
16. A method for the treatment of a patient having need of CSBP $\beta$  comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the polypeptide of claim 11.

整理番号 159287

17. The method of Claim 16 wherein said therapeutically effective amount of the polypeptide is administered by providing to the patient DNA encoding said polypeptide and expressing said polypeptide *in vivo*.

18. A method for the treatment of a patient having need to CSBP $\beta$  polypeptide comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antagonist of Claim 15.

19. A process for diagnosing a disease or a susceptibility to a disease related to expression of the polypeptide of claim 11 comprising determining a mutation in the nucleic acid sequence encoding said polypeptide.

20. 20. A diagnostic process comprising analyzing for the presence of the polypeptide of claim 11 in a sample derived from a host.

21. A method for identifying compounds which bind to and activate or inhibit a receptor for the polypeptide of claim 11 comprising:

a. contacting a cell expressing on the surface thereof a receptor for the polypeptide, said receptor being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a compound to said receptor, with a compound to be screened under conditions to permit binding to the receptor; and

b. determining whether the compound binds to and activates or inhibits the receptor by detecting the presence or absence of a signal generated from the interaction of the compound with the receptor.

22. A method for identifying a compound as a CSAID, comprising:

a. contacting a known CSAID labelled with an analytically detectable reagent with a CSBP $\beta$  under conditions sufficient to form a CSAID/CSBP $\beta$  complex;

b. contacting said complex with a sample comprising a compound to be identified; and

c. identifying the compound as a CSAID by detecting the ability of said compound to alter the amount of labelled CSAID in said complex.

23. The method according to Claim 22 wherein the CSBP $\beta$  is in a form selected from the group consisting of whole cells, cytosolic cell fractions, membrane cell fractions, and purified or partially purified form.

整理番号 159287

24. A method for identifying a compound as a CSAID comprising:
  - a. forming soluble cytosolic fraction from a cell expressing a CSBP $\beta$ ;
  - b. contacting said fraction with a CSAID labelled with an analytically detectable reagent under conditions sufficient to form a reagent CSAID/CSBP $\beta$  complex;
  - c. contacting said complex with a sample containing a CSAID; and
  - d. detecting the CSAID by measuring a decrease of the amount of reagent in the labelled CSAID/CSBP $\beta$  complex.
25. The method according to Claim 24 wherein said cell is a human monocyte.
26. The method according to Claim 24 wherein said cell is a recombinant host cell.
27. The method according to Claim 24 wherein said reagent is a radioactive label.
28. A method for identifying ligands capable of binding to a CSBP $\beta$ , comprising:
  - a. contacting a recombinant host cell expressing a CSBP $\beta$  with a ligand to be identified under conditions to permit binding; and
  - b. detecting the presence of any ligand-bound protein.
29. The method according to Claim 28 wherein the recombinant host cell expresses said CSBP $\beta$  at its cell surface.
30. The method according to Claim 28 wherein the protein or a membrane fraction containing the protein is isolated from said cell prior to contacting with the ligand to be identified.
31. An antagonist or agonist compound identified by the method of Claim 22.
32. A pharmaceutical composition comprising a compound identified by the method of Claim 22 and a pharmaceutically acceptable carrier.
33. A transgenic non-human mammal capable of expressing in any cell thereof the DNA of Claim 1.
34. A method of screening compounds to identify those compounds which bind to a human CSBP $\beta$ , comprising:
  - a. contacting the fusion protein comprising a CSBP $\beta$  domain and a binding protein/ligand binding indicator domain with a plurality of compounds under conditions to permit binding to the CSBP $\beta$  domain; and

整理番号 159287

- b. identifying those candidate drugs capable of enhancing or inhibiting the activity of the protein/ligand binding indicator domain.

35. A method of screening compounds to identify those compounds which bind and inhibit the kinase activity of human CSBP $\beta$ , comprising:

- a. contacting CSBP $\beta$  with a plurality of compounds under conditions to permit binding to the CSBP $\beta$ ; and
- b. identifying those candidate drugs capable of enhancing or inhibiting the kinase activity CSBP $\beta$

36. A method of screening compounds to identify those compounds which bind and inhibit the activation of human CSBP $\beta$  kinase activity comprising:

- a. contacting CSBP $\beta$  with a plurality of compounds under conditions to permit binding to the CSBP $\beta$ ; and
- b. identifying those candidate drugs capable of enhancing or inhibiting the activation of the kinase activity of CSBP $\beta$

37. A method of treating a cytokine-mediated inflammatory disease by administering to a patient in need thereof an CSBP $\beta$ -inhibiting amount of a CSAID.

38. The method according to Claim 35 wherein said disease is selected from the group consisting of SDAT, MS, cerebral malaria, stroke, head trauma, spinal cord injury, atherosclerosis, restenosis, ARDS, RA, OA, IBD, psoriasis, dermatitis, asthma, osteoporosis, sepsis, chronic renal failure, transplant rejection, lupus, graft versus host disease, AIDS and cachexia.

39. The method according to Claim 35 wherein said CSAID inhibits the kinase activity of said CSBP $\beta$ .

40. The method according to Claim 35 wherein said CSAID inhibits the association of the CSBP $\beta$  with its substrate.

41. A CSAID which functions by inhibiting the kinase activity of CSBP $\beta$  and/or the association of a CSBP $\beta$  with its substrate.

CGACGAGCCGACGCGCCCGCCGCTCGGGGTCGCGAGATGCGGATGCCCGGATGACCCGCTC	60
M S L I	
CGGAAAAAGGCGCTTTTACAGCGAGGAGCTCAACAGAGCCCGCTGGGAGCTGCCGACGACC	120
N K X G P Y K O E L N K T A W E L P E T	
TACGCTCTCCCGAGCGCAGCTCGGCGAGCGGGGCGCTATGGGCTCTTGCTGCTCGGCATCGAC	180
V V S P T H V G S G A Y G S W C S A I D	
AACXGTTTAGGGAGAGAGGTGGCLATCAGAGAGCTGAGCCGACCCCTTTCACTCCGAGATT	240
K R S G E K V A I K K L S R P F Q S S I	
TTCCGAGAGCGCGCTTACCGGAGGCTGCTGCTGCTGAGCGCATGCGAGCTGAGGAGCTC	300
F A K R A Y R E L L L L K H M O H E N V	
ATTGGGCTGCTGAGATGTTTTACCGCGCGGCTGCTGCTGCGGAGCTTCTATGACTTCTAC	360
I G L L D V F T P A S S L R N F Y D F Y	
CTGGTATGCGCTTCATGCGAGCGGATCTGCGAGAGATCATCGCGAGTGGGCTTCACTGAG	420
L V H P F M Q T D L Q K I N G M E F S E	
GAGAGATCCAGTACCTGGTGTATGAGATGCTCAAGGCGCTTAACTACATCCACTCTGGT	480
E E I Q Y L V Y Q M L K G L E Y I H S A	
GGGCTGCTGCGAGGAGCTTGAAGCCAGGCGAAGCTGGCTGTGAATGAGGAGCTGTGAAGT	540
C V V H R D L K P G N L A V N E D C E L	
AGGATTTTGGATTTTGCGCTGGGCGAGATGCGAGGCGGAGATGAGTGGCTTACGCTGCTG	600
K I L D F G L A R H A D A E M T S Y V V	
ATCXGCTGCTACCGAGCGCCCGGAGGTGATGCTGAGCTGGATGCACTACAGCGGAGAGT	660
T E W Y R A P E V I L S W M H Y N Q T V	

整理番号 159287

ページ(2)

GACATCTGCTCTGCTGCTCTATCATGCGAGAGATGCTGACAGCGGAACTCTCTTTAG 720  
 D I N S Y G C I N A E N L T S K I L F K  
 GCGAAGGATTACCTGACCCAGCTGACCCAGATCTGAACTGACCGGCTGCTGCTGAC 780  
 C K D Y L D Q L T Q I L K Y T G V F G T  
 GAGTTTGTGAGAGGCTGAACTGAAAGCGGCGAAAGCTGACGCACTGCTGCTGAC 840  
 E P Y Q K L N D K A A K S Y T Q S L F Q  
 AGCTTCAGAGAGGATTCACTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 900  
 T P R R D P T Q L F P R A S F Q A D L  
 CTGACAGAGATGCTGAGCTGACGCTGACGAGAGGCTGACGAGAGAGAGAGAGAG 960  
 A X K M L E L D V D K E L T A A Q A L T  
 CAGCTCTCTCTGAGAGCTGCTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG 1020  
 H P F F E P F R D P E E E T E A Q Q P P  
 GATGATCTCTGAG 1080  
 D E S L E H E K L T V D E R K Q K I Y K  
 GAGATTGCTGAG 1140  
 E I Y N F S P I A R K D S R R R S O N E  
 CTGAG 1200  
 L \*  
 TCGTACAG 1260  
 TCTCTGAG 1320  
 AACTAG 1380  
 GAG 1440  
 ATGAG 1500

整理番号 159287

ページ(3)

GGATGGAACAGCAGCAACTTGAATTCCTTACAGTTCTGGAGGCTGGAAATTTGGGATGGA 1550

CGTCTGGCAGGGCTGTTGGTGGCTTTTAAAGGCTCTGGGAGAGATTCCTTCTGGCTCTT 1620

TTTACCTTGTGGGGCTGTGGGCAATCGGTGGGCTTCCCGAGCTTATTGCTGCAATCTC 1688

CAATCTCTGGCT 1748

CTTGAATCTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG 1800

CAATGAAGTCTCAATCTCTCAATCTCTCAATCTCTCAATCTCTCAATCTCTCAATCTCTCA 1838

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

This invention relates to drug binding proteins, to genes encoding same and to assays and methods for screening pharmaceuticals. More specifically, this invention relates to a Cytokine Suppressive Anti-Inflammatory Drug (CSAID) binding protein CSBP $\beta$ , to a gene encoding same and to assays and screens useful in the evaluation and characterization of drugs of this pharmacologic class.